



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDEZ DE GLUCÓMETROS PORTÁTILES COMO MÉTODO
ALTERNATIVO EN EL LABORATORIO CLÍNICO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

JUAN FRANCISCO MARTÍNEZ BENAVIDES



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARCO ANTONIO ORTIZ JIMÉNEZ

VOCAL: LAURA ELIZABETH PENICHE VILLALPANDO

SECRETARIO: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

1° SUPLENTE: ÁNGEL ÁVILA VILLAGRÁN

2° SUPLENTE: YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO CLÍNICO “FELIPE SEMMELWEIS” EN
CUERNAVACA, MORELOS.**

ASESOR DEL TEMA: MARCO ANTONIO ORTIZ JIMÉNEZ

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: VERÓNICA DOMÍNGUEZ V.

(nombre y firma)

SUSTENTANTE: JUAN FRANCISCO MARTÍNEZ BENAVIDES

(nombre (s) y firma (s))

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por darme la vida, una maravillosa formación, por su ternura y todo su amor, y por contagiarme de sus mayores fortalezas. Mamá, me diste como ejemplo el ser perseverante, decidido y esforzarme en cada momento para ser una mejor persona cada día, me enseñaste a aprender de los errores y a tener siempre un colchón para los tiempos difíciles. Papá, me enseñaste a que para todo en la vida hay tiempo, me enseñaste a ser perseverante y paciente, a poner pasos fijos para alcanzar mis metas, a mantenerme tranquilo frente a los problemas y buscar soluciones con la cabeza fría. A ambos que me enseñaron a que toda disciplina tiene su recompensa y a enseñarme muchos hábitos como la puntualidad y sobre todo tener coherencia entre las palabras y las acciones.

A mi hermano por poner a prueba mi paciencia y mis habilidades de negociación, y por darme la oportunidad de conocerlo como persona y por compartirme sus conocimientos.

A mi novia Maricela por su apoyo incondicional en todo momento, por no dejarme caer y por ayudarme a descubrir una nueva etapa en mi vida, y aprender que los problemas no se hacen grandes si se tratan a tiempo.

A mis profesores por contribuir fuertemente en mi educación, y no sólo profesional que ahora llega a una gran meta, sino también en mi educación personal. Por enseñarme que un número no refleja el conocimiento adquirido, por entrenarme en el trabajo en equipo y por poner a mi alcance un gran número de herramientas necesarias para salir adelante y destacar como profesionista. Gracias maestro Marco Antonio Ortiz por su apoyo y su guía en éste gran proyecto y por darme la oportunidad de aplicar los conocimientos adquiridos en el ámbito laboral. Gracias maestro Armando Muñoz Comonfort por su guía y asesorías durante la realización del proyecto, por enseñarme a comprender un poco más la estadística y el pensar de un investigador.



Por último quiero agradecer a esta hermosa Universidad por permitirme crecer en todos los aspectos de mi persona, por ofrecerme todas las actividades y cursos que contribuyeron a mi educación y porque aquí he vivido la mejor etapa de mi vida.



ÍNDICE

Introducción.

1. Generalidades. ----- (1)
 - 1.1 Estructura y Configuración de la Glucosa.
2. Metabolismo de la glucosa.----- (6)
 - 2.1 Co-Transportadores de Sodio y Glucosa.
 - 2.2 Transportadores de Difusión Facilitada para Hexosas (GLUTS).
 - 2.3 Vías Principales del Metabolismo de la Glucosa.
 - 2.3.1 Catabolismo de la Glucosa (Glucólisis).
 - 2.3.1.1 Funciones e Importancia de la Glucólisis.
 - 2.3.1.2 Estadios de la Glucólisis.
 - 2.3.1.3 Producción de energía da la Glucólisis.
 - 2.3.1.4 Importancia de la regeneración de NAD^+ a partir de NADH.
 - 2.3.1.5 Regulación de la Glucólisis.
 - 2.3.2 Vía de las Pentosas Fosfato.
 - 2.3.2.1 Principales Funciones.
 - 2.3.2.2 Estadios de la Vía.
 - 2.3.2.3 Control de la Vía de las Pentosas Fosfato.
 - 2.3.3 Metabolismo del Glucógeno (Glucogénesis).
 - 2.3.3.1 Depósitos de Glucógeno.
 - 2.3.3.2 Estructura del Glucógeno.
 - 2.3.3.3 Síntesis del Glucógeno: Glucogénesis.
 - 2.3.3.4 Degradación del Glucógeno: Glucogenólisis.
 - 2.3.3.5 Regulación del Metabolismo del Glucógeno.
3. Homeostasis de la Glucosa. ----- (32)
 - 3.1 Factores que regulan la Concentración de Glucosa en Sangre.
4. Patologías de la Glucosa en Sangre. ----- (38)
 - 4.1 Diabetes Mellitus.
 - 4.2 Clasificación.
 - 4.2.1 Diabetes Mellitus Tipo 1.

4.2.2	Diabetes Mellitus Tipo 2.	
4.3	Complicaciones Agudas de la Diabetes Mellitus.	
4.4	Complicaciones Crónicas de la Diabetes Mellitus.	
5.	Medición de glucosa en sangre. -----	(48)
6.	Antecedentes. -----	(50)
7.	Justificación. -----	(52)
7.1	Hipótesis.	
7.2	Objetivo General.	
7.2.1	Objetivos Particulares.	
7.3	Tipo de Investigación.	
7.4	Diseño Experimental.	
7.4.1	Síntesis del Proyecto.	
8.	Material y método. -----	(55)
8.1	Material biológico.	
9.	Análisis Estadístico. -----	(55)
9.1	Prueba estadística.	
9.2	Regla de decisión.	
10.	Resultados. -----	(57)
11.	Discusión. -----	(65)
12.	Conclusiones. -----	(69)
13.	Anexo-----	(70)
13.1	Protocolo de Toma de Muestra Sanguínea, Sangre Venosa.	
13.2	Protocolo del Glucómetro Comercial OpXc.	
13.3	Protocolo del Glucómetro Comercial AcCh.	
13.4	Protocolo de Determinación de Glucosa en Sangre, Método Enzimático por Colorimetría de N,N-Dietilnilina-4-Aminoantipirina.	
13.5	Criterios de Laboratorio para Especímenes Inaceptables.	
13.6	Preparación de Reactivos.	
14	Bibliografía. -----	(85)

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES

La glucosa es una molécula perteneciente al grupo de los carbohidratos⁴⁰. Los carbohidratos son las moléculas más abundantes que se encuentran en el ambiente y están ampliamente distribuidos en los organismos vivos en forma de: elementos estructurales como en la pared celular de bacterias y plantas, en el tejido conectivo y en el cartílago de los animales, algunos carbohidratos se unen covalentemente a proteínas o lípidos participando en la adhesión y reconocimiento entre células, también los carbohidratos, principalmente los monosacáridos y mayoritariamente la glucosa, son utilizados es la vía central de producción de energía en las células no fotosintéticas por medio del proceso de oxidación⁸⁰.

Los carbohidratos son cetonas o aldehídos polihidroxilados⁴⁸. La mayoría de los carbohidratos poseen la fórmula empírica $(\text{CH}_2\text{O})_n$ y algunos contienen en su estructura átomos de nitrógeno, fósforo o azufre⁶⁷. Existen tres clases principales de carbohidratos: Los monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

Los monosacáridos o azúcares simples consisten en una sola unidad de aldehído o cetona polihidroxilada, siendo la D-glucosa el monosacárido más abundante en la naturaleza⁴⁸.

Son sólidos cristalinos, incoloros, son muy solubles en agua e insolubles en solventes no polares. Una característica común de los monosacáridos es que se representan en forma de cadena no ramificada (lineales) en donde todos los átomos de carbono están enlazados por enlaces simples⁸⁰. Muchos de los átomos de carbono de cada grupo hidroxilo de los monosacáridos son centros quirales, todos los monosacáridos poseen éstos centros, excepto la dihidroxiacetona, lo cual pueden encontrarse muchos esteroisómeros en la naturaleza⁶⁷. Los monosacáridos de cuatro a siete átomos de carbono son aldosas y cetosas, si el grupo carbonilo se encuentra al final de la cadena de átomos de carbono es una

aldosa y si el grupo carbonilo se encuentra en otra posición va a pertenecer al grupo de las cetosas.

Todos los monosacáridos se designan con la letra D o L, de acuerdo con la similitud que posean con el D-gliceraldehído o el L-gliceraldehído⁸⁰. Estos símbolos se usan para designar la configuración del último átomo de carbono asimétrico, aquellos monosacáridos en los cuales la configuración es similar al D-gliceraldehído son designados como isómeros-D y aquellos con la misma configuración que el L-gliceraldehído, son designados isómeros-L⁴⁸. La configuración absoluta de los azúcares se conoce por cristalografía de rayos x, que representa el azúcar en tercera dimensión y se utiliza la fórmula de proyección de Fischer para representar la estructura del azúcar en papel⁴⁸.

Otra característica de los monosacáridos es que pueden ser oxidados por agentes oxidantes suaves como los iones de Fe^{3+} o Cu^{2+} . El carbono del carbonilo es oxidado a un grupo carboxilo, la glucosa y otros azúcares son capaces de reducir los iones de Fe^{3+} y Cu^{2+} , llamándose azúcares reductores⁴⁰.

Los oligosacáridos consisten en cadenas cortas de unidades de monosacáridos, o residuos, unidos covalentemente por enlaces O-glicosídicos, los cuales se forman cuando un grupo hidroxilo (-OH), de un azúcar reacciona con el carbón anomérico de otro azúcar produciendo la formación de un acetal a partir de un hemiacetal. Los enlaces glicosídicos son hidrolizables por ácidos pero son resistentes frente a bases⁴⁸.

Los oligosacáridos más abundantes se forman a partir de dos unidades de monosacáridos y se conocen como disacáridos, los más comunes son: la sacarosa (caña de azúcar), que consiste en dos azúcares de seis carbonos D-glucosa y D-fructosa, la maltosa, formada por dos unidades de D-glucosa y la lactosa, formada por dos azúcares la D-glucosa y la D-galactosa⁴⁵.

En las células, muchos oligosacáridos se forman de tres o más monosacáridos que no existen en el ambiente, suelen unirse covalentemente a biomoléculas, tales

como lípidos (glicolípidos) o proteínas (glicoproteínas), a estas moléculas híbridas se conocen como glicoconjugados. Las funciones que realizan los glicoconjugados son variadas: sirven como mediadores específicos en interacciones intercelulares e interacciones con la matriz extracelular, favorecen el proceso de adhesión, la coagulación sanguínea y la respuesta inmune^{40, 45}.

Los polisacáridos son polímeros de azúcares que contienen 20 unidades de monosacáridos o más, su peso molecular es muy elevado y también son llamados glicanos. Los polímeros consisten generalmente de unidades de D-glucosa que difieren en el tipo de enlace glicosídico y por consiguiente difieren en sus propiedades y actividades biológicas, algunos polisacáridos se pueden encontrar como estructuras lineales (celulosa) o en forma ramificada (glucógeno)⁸⁰.

Los polisacáridos se diferencian en dos grupos dependiendo de las unidades de monosacáridos que estén formando el polímero: Los homopolisacáridos contienen una sola especie de monómero y los heteropolisacáridos contienen dos o más especies de monómeros⁴⁰. Los polisacáridos son utilizados por los organismos para realizar diferentes funciones, sirven como elementos estructurales en la formación de la pared celular de plantas y en el exoesqueleto de los insectos, como la celulosa y la quitina, brindan soporte extracelular a las bacterias como peptidoglicanos. También muchos polisacáridos sirven para el almacenamiento de monosacáridos que son utilizados como principal fuente de energía. Estos polisacáridos se encuentran en forma de gránulos dentro de las células animales y vegetales, siendo respectivamente el glucógeno y el almidón⁴⁵.

1.1 ESTRUCTURA Y CONFIGURACIÓN DE LA GLUCOSA

La glucosa es el carbohidrato más abundante que existe en la naturaleza, se emplea como fuente primaria de síntesis de energía de las células mediante su oxidación catabólica. Su oxidación ocurre principalmente en los músculos, hígado y cerebro de los animales también se almacena en el hígado en forma de glucógeno y éste se hidroliza para reponer la glucosa en la sangre⁴⁰.

La fórmula empírica de la glucosa se establece como ($C_6H_{12}O_6$), es un carbohidrato perteneciente al grupo de los monosacáridos, posee un grupo aldehído de seis átomos de carbono identificando a la glucosa como una aldohexosa⁴⁵.

Heinrich Kiliani (1886), demostró que los seis átomos de carbono de la glucosa forman una cadena no ramificada. Él observó que al reaccionar con metanol y cloruro de hidrógeno gaseoso con la glucosa formaban dos compuestos diastereoisómeros que tenían un grupo $-OCH_3$. Estas observaciones concordaban con una estructura hemiacetálica cíclica para la glucosa⁴⁸.

Los hemiacetales o hemicetales se forman con aldehídos o cetonas que reaccionan con los alcoholes, en medio ácido, dando lugar a una reacción de equilibrio que se encuentra desplazada a la izquierda, éstos hemiacetales o hemicetales contienen un átomo de carbono asimétrico adicional y puede existir en dos formas estereoisoméricas.

Heinrich Kiliani observó como reaccionó una molécula de metanol con una molécula de glucosa para formar un acetal, esto indicó que la glucosa posee un hemiacetal en su estructura, esto quiere decir que posee un grupo carbonilo y cinco grupos hidroxilo^{40, 48}.

Como los grupos carbonilo e hidroxilo están en la misma molécula, se puede llevar a cabo una adición nucleofílica intramolecular, dando origen a un hemiacetal cíclico, los hemiacetales cíclicos de cinco o seis miembros son muy estables. Se encontró que el grupo carbonilo de la glucosa forma la estructura hemiacetálica con el grupo hidroxilo en el $C_{\#5}$ de la misma molécula formando un anillo de 6 miembros o piranosa, por que su estructura se asemeja a la estructura de un pirano⁴⁸.

En solución acuosa la glucosa y todos los monosacáridos con cinco o más átomos de carbono se encuentran predominantemente en forma cíclica. Se forma una mezcla, en equilibrio, de las dos formas hemiacetálicas cíclicas diastereoisómeras

y de la forma aldehídica de cadena abierta, solo el 0.5% de las moléculas de glucosa se encuentran en la forma de cadena abierta. Las estructuras cíclicas presentan anómeros alfa y beta, esto es porque el C_{#1} es asimétrico y produce los dos estereoisómeros, éste átomo de carbono es llamado carbón anomérico⁴⁸. Estos anómeros, α y β de D-glucosa se interconvierten en solución acuosa por un proceso llamado mutarotación y no presentan diferencias de composición estructural, pero si diferentes características físicas y químicas. (Fig. 1).

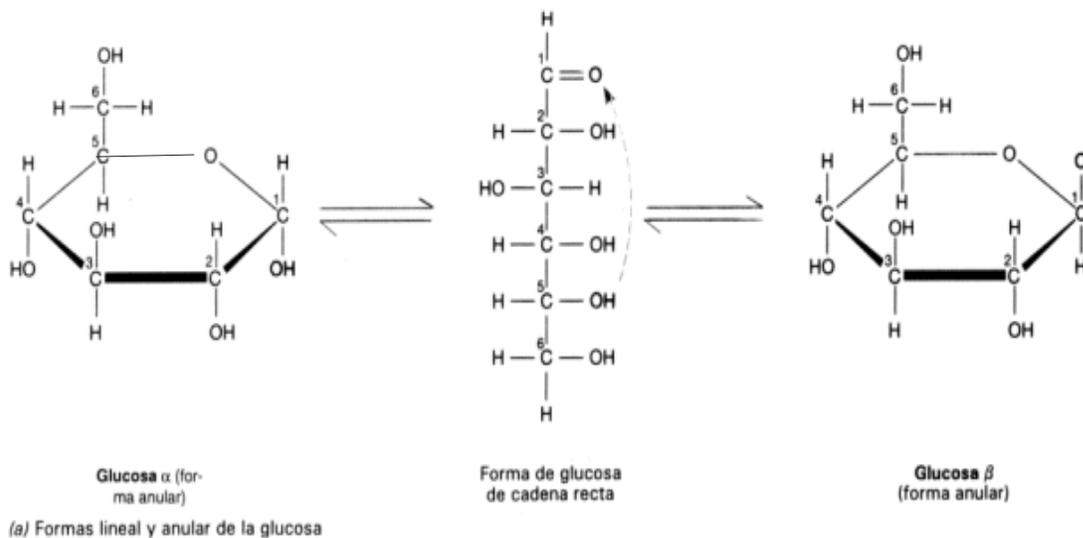


Figura 1. Mezcla en equilibrio de la molécula de la D- Glucosa en solución acuosa.

La mezcla que se forma en solución acuosa con la D-glucosa existe en un eventual equilibrio que posee propiedades ópticas idénticas, ésta mezcla consiste de 1/3 de α -D-glucosa, 2/3 de β -D-glucosa y una pequeña fracción de forma lineal⁴⁸.

La fórmula de perspectiva de Haworth es comúnmente utilizada para mostrar la estereoquímica de la forma de los monosacáridos en anillo, indica que el anillo de la D-glucosa (piranosa) no es plana sino que la molécula sume dos conformaciones en silla. Las dos conformaciones son interconvertibles y sin ruptura de los enlaces covalentes.

2. METABOLISMO DE LA GLUCOSA

La glucosa ocupa una posición central en el metabolismo de plantas, animales y muchos microorganismos, sirve como fuente importante de energía para que se lleven a cabo funciones importantes como la oxidación y el almacenamiento⁴⁰. La oxidación completa de la glucosa a dióxido de carbono (CO_2) y agua produce un cambio de energía libre de $-2,840 \text{ KJ/Mol}^{45}$.

El metabolismo de los carbohidratos, se divide en tres etapas diferenciadas^{40, 45}:

- ❖ La primera etapa consiste en la transformación de los polímeros (polisacáridos), en sus monómeros integrantes (monosacáridos), en ésta etapa catabólica se incluyen los procesos de digestión y absorción de los monómeros hasta su incorporación al citoplasma celular. No hay liberación de energía de Gibbs utilizable por la célula.
- ❖ La segunda etapa comprende la degradación celular de los monosacáridos hasta metabolitos intermediarios (piruvato, acetyl-CoA). Parte de la energía de Gibbs que se libera puede almacenarse en forma de adenosin trifosfato (ATP) y también átomos de hidrógeno que se emplean para reducir ciertos nucleótidos (NADH, NADPH, FADH_2).
- ❖ La tercera etapa, se lleva a cabo la oxidación de los metabolitos intermediarios y los nucleótidos reducidos. El carbono de las moléculas suele oxidarse hasta CO_2 y el hidrógeno en H_2O . En esta etapa se maximiza la liberación de energía de Gibbs que se canaliza hacia la formación de ATP (principalmente en la cadena respiratoria).

La glucosa, así como la galactosa y la fructosa, se obtienen de la degradación de los polisacáridos (almidón, glucógeno), así como de disacáridos (sacarosa, lactosa, maltosa). Estos monosacáridos son incapaces de difundir directamente a través de las membranas celulares por lo que requieren proteínas transportadoras especializadas para entrar al interior célula para poder llevar a cabo las funciones de oxidación y almacenamiento⁴⁰.

Los transportadores de glucosa pertenecen a un grupo de transportadores constituida por 2 familias de proteínas: la familia de los Glut's (del inglés Glucose Transporters) y la familia de los co-transportadores de sodio y glucosa⁸.

Todos los transportadores de membrana que medían la transferencia de solutos desde el espacio extracelular hacia el citosol (o viceversa) comparten tres características⁴⁰:

- ❖ Especificidad: Cada transportador es específico para una sola sustancia o un grupo muy emparentado de ésta.
- ❖ Saturación: La capacidad de transporte puede alcanzar un máximo cuando todos los sitios de unión para el soluto a transportar están ocupados.
- ❖ Competición: Ocurre cuando más de una sustancia es capaz de ser transportada por el sistema transportador, el soluto que se encuentre en mayor concentración será preferentemente transportado.

2.1. CO-TRANSPORTADORES DE SODIO Y GLUCOSA

En el epitelio intestinal existen sistemas de co-transporte de glucosa acoplada a Na^+ , la glucosa procedente de la nutrición se concentra activamente en las células con microvellosidades o con borde en forma de cepillo. Estos sistemas permiten la absorción rápida de la glucosa desde el íleon hacia el sistema portal. También existen en el epitelio de los túbulos contorneados proximal y distal permitiendo la reabsorción de la glucosa filtrada por el glomérulo hacia el torrente sanguíneo⁸⁰.

El sistema de los co-transportadores de Na^+ /Glucosa (SGLT, Sodium/Glucose Transporters), aprovecha el transporte del Na^+ a favor de un gradiente de concentración para generar una corriente electroquímica que produce los cambios conformacionales necesarios para la traslocación de la glucosa a través de la membrana plasmática⁴⁰.

Existen 6 tipos de SGLT's, el principal transportador de glucosa se denomina SGLT-1. Este transportador se expresa primariamente a nivel del íleon, el sitio

fundamental de absorción de monosacáridos, es específico para la absorción de glucosa y galactosa en las células epiteliales del ribete en cepillo⁸.

La absorción de monosacáridos ocurre en cuatro fases:

1. Unión de dos iones Na^+ a la cara externa del transportador, lo que produce un cambio conformacional que permite el acoplamiento de una molécula de glucosa o galactosa.
2. Transferencia del Na^+ y del monosacárido hacia la cara citoplasmática del transportador por un segundo cambio conformacional ocasionado por la glucosa y que involucra la rotación y el re-arreglo de la estructura α -helicoidal del SGLT-1.
3. El monosacárido se disocia del transportador y pasa al citosol y después expulsa los dos iones de Na^+ , restituyendo al transportador a su forma libre de ligando.
4. Ocurre un cambio conformacional que permite la fijación de otra molécula de glucosa y dos iones de Na^+ en el lado extracelular (Fig. 2).

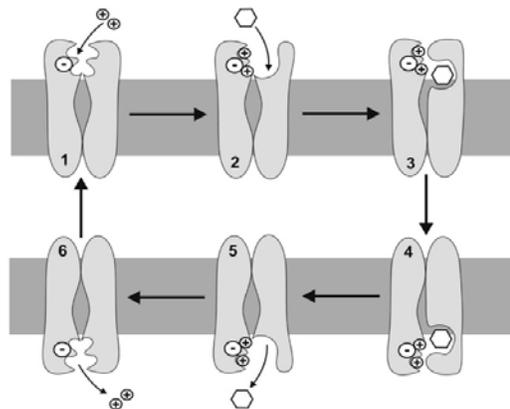


Figura 2. Mecanismo postulado para el transporte de Na^+ y Glucosa por el SGLT-1. Este proceso aparentemente ocurre en 4 fases definidas: a) Unión de dos iones Na^+ al co-transportador (1 y 2). b) Esto produce cambios en la conformación del SGLT-1 que permite la unión de una molécula de glucosa (3). c) Luego ocurre una re-organización estructural que lleva el Na^+ y la glucosa hacia la cara citosólica del transportador (4). d) Libera la molécula de glucosa y luego los iones de Na^+ hacia el citosol.

El gradiente electroquímico de Na^+ entre la luz intestinal y la célula epitelial se mantiene gracias a la bomba de Na^+/K^+ situada en la membrana basolateral, lo que mantiene un circuito de circulación de sodio que impulsa la absorción eficiente de la glucosa⁴⁰.

El SGLT-2 se expresa fundamentalmente en la corteza renal, en las células epiteliales del túbulo contorneado proximal, y en mucho menor grado en el íleon. Su función principal es la reabsorción de Na^+ , glucosa y agua a nivel renal bajo los mismos principios del SGLT-1⁸.

El SGLT-3 se ha detectado en músculo esquelético, sistema nervioso central y en neuronas de los plexos nerviosos sub-mucosos y mioentéricos a nivel de la placa motora. Tiene baja afinidad por la glucosa (50 mM) así como una muy baja capacidad de transporte de la misma. Se comporta como un glucosensor en la membrana plasmática de las neuronas colinérgicas y del tejido muscular liso y estriado⁸⁰.

El SGLT-4 y el SGLT-5 fueron aislados recientemente de bibliotecas de ADNc de intestino delgado humano. EL ARNm del SGLT-4 se encuentra fundamentalmente en el intestino y riñón, la manosa tiene una potente actividad inhibidora del transportador de glucosa, se cree que es capaz de transportar casi todos los monosacáridos presentes en la dieta. El ARNm del SGLT-5 se encuentra fundamentalmente en el intestino delgado y riñón. El gen del transportador SGLT-6 comparte una gran homología con el SGLT-1⁸.

2.2 TRANSPORTADORES DE DIFUSIÓN FACILITADA PARA HEXOSAS (GLUTS)

Muchas de las células eucarióticas incorporan glucosa a través de la difusión facilitada por transportadores de glucosa embebidos en la membrana plasmática. Los GLUT poseen características comunes en términos bioquímicos denominados “firma molecular de los transportadores de glucosa”, es un conjunto de secuencias primarias aminoacídicas extremadamente conservadas que determinan

estructuras secundarias y terciarias que son responsables de las características funcionales de la proteína, Se han identificado al menos cinco transportadores denominados GLUT-1 a GLUT-5; cada uno tiene una distribución tisular diferente^{40,80}.

En 1977 se descubrió el primer transportador de glucosa a partir de membranas de eritrocitos y fue conocido como GLUT-1⁸.

EL GLUT-1 se conoce como transportador de glucosa de eritrocitos/cerebro. Es una proteína altamente hidrofóbica ya que el 60% de sus residuos de aminoácidos son hidrofóbicos. El GLUT-1 parece ser el transportador de glucosa más ampliamente distribuido en el ser humano, se expresa en numerosos tejidos como en los eritrocitos, células endoteliales, células nerviosas, placenta, glóbulos blancos, células de la retina, riñón, tejido adiposo, etc^{8, 40}.

El GLUT-1 posee una alta afinidad por la glucosa ($K_M=1-2$ mM), es capaz de transportarla al interior de las células prácticamente a cualquier concentración y se considera como un transportador basal de glucosa que mantiene su concentración intracelular estable, es de gran importancia en aquellas células que requieren un suministro constante de glucosa para su producción de energía.

El transporte facilitado de glucosa ocurre mediante cambios conformacionales en la estructura terciaria del transportador, inducidos por la unión de la molécula de glucosa a un sitio de unión en la cara extracelular del transportador y su movimiento progresivo hacia la cara intracelular del mismo donde existe otro sitio de unión a la glucosa. Ambos sitios no pueden ser ocupados al mismo tiempo, por lo que debe transportarse una sola molécula de glucosa a la vez⁸⁰.

El GLUT-2 es un transportador de glucosa de baja afinidad ($K_M= 15-20$ mM) que se expresa en el hígado, riñón, células beta de los islotes de Langerhans y en la membrana basolateral de las células epiteliales del intestino delgado. Gracias a su K_M , este GLUT transporta glucosa proporcionalmente a su concentración por lo que se le atribuye la propiedad de glucosensor en las células que lo poseen, en

especial el hígado y células beta pancreáticas. El GLUT-2 actúa como un regulador que solo permite la entrada de glucosa cuando está lo suficientemente elevada en plasma como para requerir la liberación de una cantidad significativamente importante de insulina⁸.

La intervención del GLUT-2 también se da durante el periodo post-prandial tardío (período de ayuno), donde el glucógeno sufre degradación generando moléculas de glucosa que salen de las células hepáticas a la sangre. El GLUT-2 es un transportador del tipo bidireccional que puede transportar glucosa desde la sangre al tejido o desde el tejido hacia la sangre.

EL GLUT-3 es un transportador de glucosa de alta afinidad ($K_M= 1-2$ mM), fue caracterizado en cerebro y se detectó en bajos niveles en miocardio fetal y adulto, placenta, hígado y músculo. La presencia de este transportador junto con el GLUT-1, tiene la función de mantenimiento del nivel basal de glucosa en neuronas y placenta⁴⁰.

El GLUT-4 es un transportador de alta afinidad para glucosa ($K_M=5$ mM) que se expresa fundamentalmente en tejido muscular estriado, tejido muscular cardiaco y adipositos. La vasta mayoría de las moléculas de GLUT-4 se encuentran localizadas dentro de vesículas en el citosol que forman dos tipos de compartimientos bien definidos, ya que un grupo de estas vesículas responden a la señal de la insulina y otro grupo responde fundamentalmente al estímulo que presenta la actividad física^{80, 8}.

El GLUT-5 es un transportador específico para fructosa ($K_M=10-13$ mM) y se expresan en las células de ribete en cepillo del intestino delgado donde media el paso de a fructosa desde el lumen de la célula epitelial intestinal. También se encuentra en bajos niveles, en eritrocitos, riñón, espermatozoides, músculo esquelético y tejido adiposo⁸.

2.3 VÍAS PRINCIPALES DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA

Después de su absorción la glucosa es captada por el hígado, los músculos, adipocitos y tejido fibroso⁴⁰. Dentro de la célula la glucosa puede seguir tres vías principales, dependiendo de la disponibilidad de sustrato o estado nutricional de la célula: Puede oxidarse a un compuesto de tres carbonos (piruvato) por la vía de la glucólisis para obtener adenosin trifosfato (ATP) e intermediarios metabólicos; o ser oxidada a través de la vía pentosa fosfato (fosfogluconato) para producir ribosa 5-fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos y Nicotiamida-Adenina Dinucleotido Fosfato (NADPH) de procesos biosintéticos reductivos; o puede almacenarse en forma de glucógeno por la vía de la glucogénesis. El objetivo final de la célula es convertir la glucosa en CO_2 y H_2O ⁸⁰. (Fig. 3)

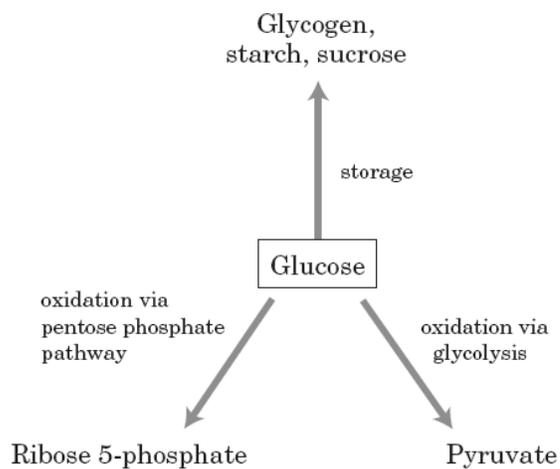


Figura 3. Principales vías de utilización de la glucosa. Aunque nos son los únicos destinos de la glucosa, estas tres vías son las más significativas en términos de la cantidad de glucosa que fluye a través de ellos, en la mayoría de las células.

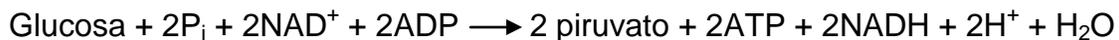
2.3.1 CATABOLISMO DE LA GLUCOSA (GLUCÓLISIS).

La glucólisis es una secuencia de diez reacciones que degradan una molécula de glucosa (un anillo de seis carbonos) en dos moléculas de piruvato (dos cadenas de tres moléculas de carbono), con la generación neta de dos moléculas de ATP y

NADH (la forma reducida del nicotinamín adenín dinucleótido), por lo tanto proporciona una parte importante de la energía utilizada por la mayoría de los organismos y proporciona productos intermedios para otras vías metabólicas⁴⁰.

El proceso de la glucólisis se lleva a cabo en el citoplasma de todas las células del organismo. A diferencia de otras vías metabólicas, la glucólisis puede producir ATP, tanto bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Bajo condiciones aeróbicas; el producto final, el piruvato, entra en la mitocondria, donde es oxidado por el ciclo del ácido tricarbónico (ATC) y la fosforilación oxidativa a CO₂ y H₂O con la producción de grandes cantidades de energía⁴⁵. La reacción global se escribe como:



Se generan dos moles de NADH a partir de la oxidación de un mol de glucosa, cada NADH es oxidado por la cadena de transporte de electrones para producir unos 2,5 ATP. El efecto neto de la glucólisis aeróbica es la generación de 7 ATP por mol de glucosa.

Bajo condiciones anaeróbicas, el piruvato es reducido por NADH a lactato en el citosol. Esto permite la producción continua de ATP en células carentes de mitocondrias o desprovistas de oxígeno. Esta vía sólo produce una pequeña cantidad de energía⁴⁵. La reacción global puede escribirse como:



El efecto neto es la producción de dos moles de ATP por la oxidación de un mol de glucosa. No hay producción neta de NADH ya que es utilizado por el lactato deshidrogenasa para reducir el piruvato a lactato. A pesar de que produce pequeñas cantidades de ATP, es una fuente de energía válida cuando el aporte de oxígeno es limitado⁸⁰.

2.3.1.1 FUNCIONES E IMPORTANCIA DE LA GLUCÓLISIS.

Para muchos tejidos la glucólisis es una vía de producción de energía de urgencia cuando el oxígeno es el factor limitante^{40, 80}. Es de máxima importancia en:

- Los hematíes, porque carecen de mitocondrias y, por tanto, tienen en la glucólisis su única vía de producción de energía.
- El músculo esquelético activo, cuando el metabolismo oxidativo no puede hacer frente a una mayor demanda de energía.
- El encéfalo, porque la glucosa es su principal combustible (utiliza unos 120 g/día).

2.3.1.2 ESTADIOS DE LA GLUCÓLISIS.

La glucólisis puede dividirse en dos fases: La primera se conoce como fase preparatoria, o de acumulo, y la segunda fase se conoce como fase de beneficios, o de generación de energía⁴⁰.

En la fase 1 o fase de acúmulo de energía (reacciones 1-5 de la Fig. 4), Se produce una fosforilación y división de la glucosa en dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato. Este proceso emplea dos moléculas de ATP para activar e incrementar el contenido de energía de los productos intermedios.

En la fase 2 o fase de generación de energía (reacciones 6-10), dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato se convierten en otras dos de piruvato con la generación de cuatro moles de ATP⁴⁵. El conjunto de la reacción se puede escribir como:



2.3.1.3 PRODUCCIÓN DE ENERGÍA DE LA GLUCOLISIS.

La producción de energía en forma de ATP se puede llevar a cabo por dos procesos: fosforilación a nivel de sustrato y fosforilación oxidativa.

La fosforilación a nivel de sustrato es la formación de ATP mediante la fosforilación directa de ADP, este proceso se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas y es importante para la generación de ATP en tejidos con escasez de oxígeno, como el músculo esquelético. Las reacciones 7 y 10 de la glucólisis (Fig. 4) son ejemplos de fosforilación a nivel de sustrato. La fosforilación oxidativa

requiere de oxígeno y es el mecanismo más importante para la síntesis de ATP. Implica la oxidación del NADH y la forma reducida de Flavín-adenín-dinucleotido (FADH₂) mediante la cadena de transporte de electrones^{40, 80}.

Tabla 1. Estadios de la glucólisis. Los pasos 1 a 10 hacen referencia a las reacciones 1 a 10 de la figura 4.

Estadios de la glucólisis		
Fase 1: Fase de acopio de energía		
Paso	Enzima	Tipo de reacción
1.	Hexocinasa: la mayoría de los tejidos. Glucocinasa: en hígado y células β del páncreas. Y Mg ²⁺ como cofactor.	Fosforilación, paso regulatorio irreversible.
2.	Fosfoglucosa isomerasa	Isomerización: aldosa → cetosa
3.	Fosfofructocinasa-1 (PFK-1) y Mg ²⁺ como cofactor.	Fosforilación, paso irreversible limitante de la velocidad de la glucólisis.
4.	Aldolasa	Escisión, FBP(6C) → DHAP(3C)+GAP(3C)
5.	Triosa fosfato isomerasa	Isomerización, la fase 1 produce dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato(GAP)
Fase 2: Fase generadora de energía , las siguientes reacciones tienen lugar para cada molécula de gliceraldehído-3-fosfato.		
6.	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Fosforilación oxidativa, se generan dos NADH por molécula de glucosa oxidada.
7.	Fosfogliceraldehído cinasa y Mg ²⁺ como cofactor.	Fosforilación a nivel de sustrato.
8.	Fosfoglicerato mutasa	Transferencia grupo fosfato de C3 a C2.
9.	Enolasa	Deshidratación.
10.	Piruvato cinasa y Mg ²⁺ como cofactor.	Fosforilación a nivel de sustrato, paso regulatorio irreversible.

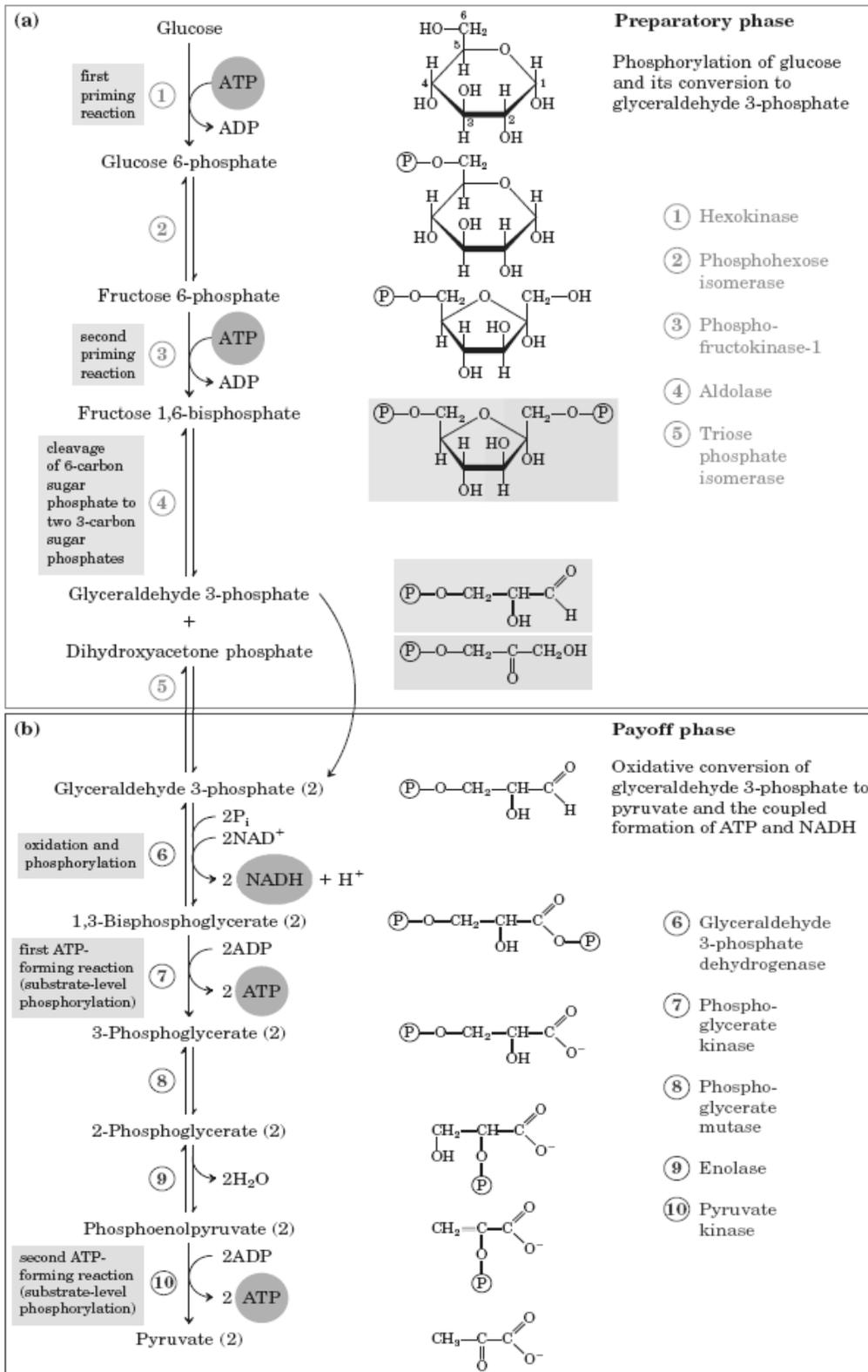


Figura 4. Las dos fases de la glucólisis. La glucólisis tiene lugar en el citosol celular y consta de dos fases distintas: de acopio de energía (1-5) y de generación de energía (6-10). El grupo fosforilo se representa como P. En la tabla (1) se hace mención de las enzimas que catalizan las reacciones 1 a 10.

2.3.1.4 IMPORTANCIA DE LA REGENERACIÓN DE NAD⁺ A PARTIR DE NADH.

El NAD⁺ es el primer oxidante de la glucólisis y un importante cofactor para la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (reacción 6 de la Fig. 4). Sin embargo solo hay una cantidad limitada de NAD⁺ disponible y su regeneración, a partir de NADH, es esencial para que continúe la glucólisis⁴⁰. Existen tres mecanismos posibles para la regeneración de NAD⁺:

- Bajo condiciones anaeróbicas, el piruvato es reducido a lactato mediante la lactato-deshidrogenasa con la oxidación simultánea de NADH a NAD⁺ en el citosol celular.
- Bajo condiciones aeróbicas, el NADH se oxida a NAD⁺ por la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. El NADH debe entrar a la mitocondria, bien a través de la lanzadera del glicerol-3-fosfato o del malato-aspartato. La lanzadera del glicerol-3-fosfato es localizada principalmente en las células cerebrales y el músculo, mientras que la lanzadera malato-aspartato se encuentra localizada en las células del hígado y corazón. Las funciones que realizan las lanzaderas son la de transportar electrones de NADH a la mitocondria para generar ATP por la cadena transportadora de electrones y regenerar el NAD⁺ para permitir la continuación de la glucólisis.
- En levaduras, bajo condiciones anaeróbicas (fermentación alcohólica), el piruvato se descarboxila a CO₂ y acetaldehído, que entonces es reducido por NADH para producir NAD⁺ y etanol.

2.3.1.5 REGULACIÓN DE LA GLUCÓLISIS.

Existen tres reacciones en la glucólisis que son irreversibles, en concreto los pasos 1, 3 y 10 (fig. 4), y se constituyen las principales zonas de regulación de la glucólisis:

PASO 1: Hexocinasa.

La hexocinasa es controlada por la inhibición del producto: niveles elevados de glucosa-6-fosfato la inhiben alostéricamente. La hexocinasa está presente en la mayoría de las células y posee una elevada afinidad por la glucosa ($K_M=0,1$ mM). Ésta enzima es muy activa cuando la concentración de glucosa en sangre se encuentra baja o en el límite. En el hígado y en las células β del páncreas, la hexocinasa es reemplazada por la glucocinasa, que tiene una menor afinidad por la glucosa ($K_M=10$ mM). Ésta enzima es activada por altas concentraciones de glucosa en sangre y por la insulina, no es inhibida por la glucosa-6-fosfato, lo que capacita al hígado a responder a niveles elevados de glucosa^{40, 80}.

PASO 2: Fosfofructocinasa-1.

La fosfofructocinasa-1 (PKF-1), es la enzima regulatoria que cataliza el paso limitante de la velocidad y es también la primera reacción de la glucólisis. Puede ser regulada de dos maneras⁴⁰:

- Regulación de la PKF-1 por niveles de energía. Los niveles altos de ATP inhiben alostéricamente la PKF-1 debido a que son indicadores de una célula rica en energía, también los niveles elevados de ATP disminuyen la afinidad de la PKF-1 por su sustrato, la fructosa-6-fosfato. Por otro lado los niveles altos de adenosin-monofosfato (AMP) activan alostéricamente la PKF-1, ya que señalan que los depósitos de energía están agotados.
- Regulación de la PKF-1 por la fructosa 2,6-difosfato. La fructosa 2,6-difosfato (F2,6-DP), es el activador alostérico más potente de la PFK-1 y de la glucólisis. Incrementa específicamente la afinidad de la PFK-1 por su

sustrato y suprime la inhibición de la enzima por el ATP. En el hígado, inhibe la fructosa 1,6-difosfatasa, una enzima de la gluconeogénesis. Por tanto la acción recíproca de la F2,6-DP asegura que las vías glucolíticas y gluconeogénicas no estén activadas al mismo tiempo.

PASO 3: Piruvatocinasa.

La piruvatocinasa cataliza el paso final de la glucólisis y está sometida tanto a regulación alostérica como a fosforilación reversible hormono-dependiente.

2.3.2 VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO.

La vía de las pentosas fosfato (VPP), también conocida como la vía del fosfogluconato, proporciona una ruta alternativa para el metabolismo de la glucosa. La mayoría de las vías atañen a la generación de ATP, ésta vía se ocupa de la producción de capacidad reductora en forma de NADPH. Como el NADH, el NADPH puede ser considerado como una molécula de alta energía, pero se emplea para reacciones de síntesis reductoras, en vez de transferir sus electrones a la cadena transportadora de electrones para fabricar ATP⁴⁰.

Ésta vía se ubica principalmente en el hígado, en las glándulas mamarias en la etapa de lactación, en tejido adiposo, en glándulas suprarrenales y en los hematíes, y se lleva a cabo en el citoplasma celular.

2.3.2.1 PRINCIPALES FUNCIONES.

Las principales funciones de la vía de las pentosas fosfato son⁸⁰:

- Generación del NADPH necesario para las reacciones reductoras de biosíntesis, como la síntesis de ácidos grasos y colesterol.
- Producción de unidades de azúcar de cinco carbonos, ribosa, para la síntesis de nucleótidos y ácido nucleico.

- En los hematíes, el NADPH se utiliza para regenerar la forma reducida del antioxidante glutatión, que protege a las células contra el daño de radicales libres, como productos intermedios oxigenados reactivos.

2.3.2.2 ESTADIOS DE LA VÍA.

La vía posee dos estadios⁴⁰:

- Fase oxidativa irreversible (Fig. 5), que consta de tres reacciones irreversibles, dando como resultado la formación de ribulosa-5-fosfato, CO₂ y dos moléculas de NADPH por molécula de glucosa-6-fosfato oxidada.
- Fase no oxidativa reversible (Fig. 6), que consta de una serie de cinco interconversiones reversibles azúcar-fosfato para la síntesis de nucleótidos o en intermediarios de la glucólisis tales como gliceraldehído-3-fosfato o fructosa-6-fosfato. Por tanto, la vía está ligada con las necesidades de la glucólisis.

Cuando se tiene un buen nivel de nutrientes, la glucosa es captada por el hígado y otros tejidos y fosforilada a glucosa-6-fosfato, que entra a la vía de las pentosas fosfato para formar fructosa-6-fosfato. La acumulación de ésta activa alostéricamente la enzima limitante de la velocidad de la glucólisis PFK-1 que, a su vez, permite la formación del piruvato. Éste se descarboxila oxidativamente a acetyl-CoA, que puede utilizarse para la síntesis de ácidos grasos⁸⁰.

En los hematíes la fructosa-6-fosfato tiene un destino diferente. La enzima fosfoglucosa isomerasa la convierte de nuevo en glucosa-6-fosfato para entrar de nuevo a la vía de las pentosas fosfato, creándose un ciclo de aporte continuo de sustrato para la ésta vía. Esto permite la producción continua del NADPH requerido para la regeneración del glutatión reducido.

Tabla 2. Estadios de la vía de las pentosas fosfato. La tabla muestra las enzimas que participan en la vía de las pentosas fosfato. Las enzimas de la fase 1 se refieren a la Fig. 5 y las enzimas de la fase 2 se refieren a la Fig. 6.

Estadios de la vía de las pentosas fosfato	
Fase 1: Fase oxidativa irreversible.	
Enzima	Tipo de reacción
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y Mg^{2+} como cofactor.	Oxidación, se produce una molécula de NADPH
Lactanasa y Mg^{2+} como cofactor.	Hidrólisis
6-fosfogluconato deshidrogenasa y Mg^{2+} como cofactor.	Descarboxilación oxidativa, se produce una molécula de NADPH
Fase 2: Fase no oxidativa reversible.	
Fosfopentosa epimerasa	Epimerización
Fosfopentosa isomerasa	Isomerización: cetosa \rightarrow aldosa
Transcetolasa, requiere pirofosfato de tiamina (TPP)	Cataliza la transferencia de fragmentos de dos carbonos de un donador (cetosa) a un aceptor (aldosa).
Transaldolasa	Cataliza la transferencia de fragmentos de tres carbonos
Transcetolasa, requiere pirofosfato de tiamina (TPP)	Cataliza la transferencia de fragmentos de dos carbonos de un donador (cetosa) a un aceptor (aldosa).

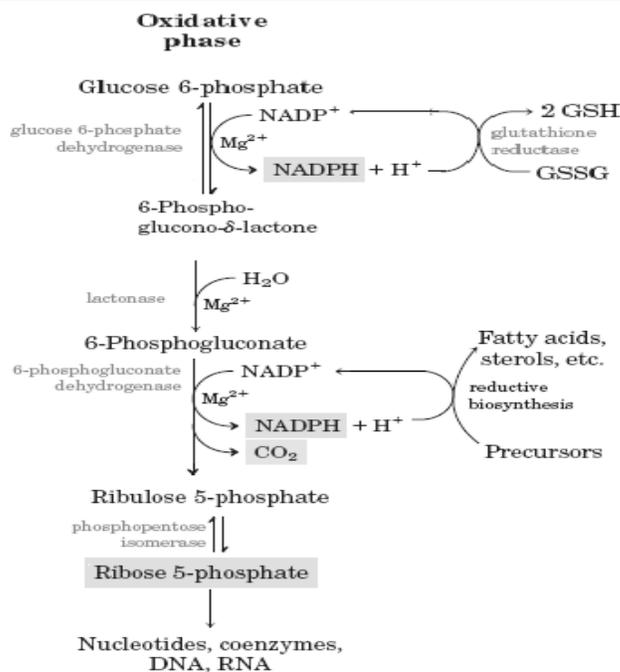


Figura 5. La vía de las pentosas fosfato: fase 1, la fase oxidativa irreversible. Tres reacciones dan lugar a la producción de dos moléculas de NADPH.

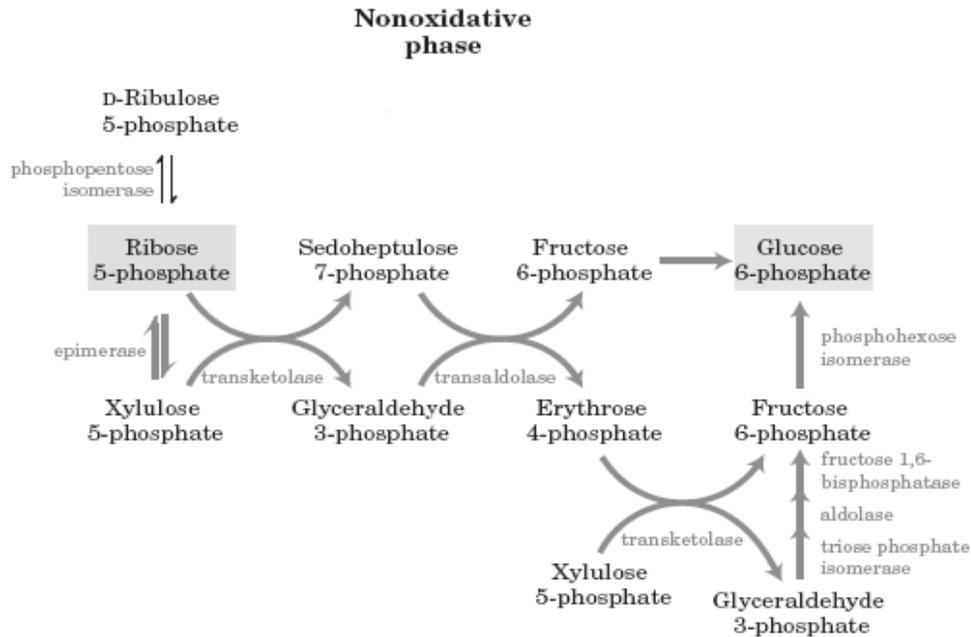


Figura 6. La vía de las pentosas fosfato: fase 2, la fase no oxidativa reversible. Estas reacciones convierten una pentosa fosfato en una hexosa fosfato, permitiendo la continuación de las reacciones oxidativas. Las enzimas transcetolasa y transaldolasa son enzimas específicas de ésta vía; las otras enzimas actúan en las vías de la glucólisis o gluconeogénesis. Cada reacción que se muestra es reversible; las flechas unidireccionales se utilizaron solamente para mantener clara la dirección durante la oxidación continua a glucosa-6-fosfato.

2.3.2.3 CONTROL DE LA VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO.

El principal control de la vía se ejerce en la reacción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Las características son^{45, 80}:

- Se trata de una reacción esencialmente irreversible.
- El principal factor de control es la proporción entre NADPH y NADP⁺.
- Al utilizar la célula NADPH, la concentración de NADP⁺ aumenta. Esto activa la vía, incrementa la formación de NADPH para compensar.

- Por tanto. La vía de las pentosas fosfato se activa por un NADPH:NADP⁺ bajo.

El control de la fase no oxidativa viene dado por el requerimiento de los productos ribosa-5-fosfato y NADPH. Las necesidades individuales de la célula de cualquiera de éstos determinan si predomina la producción de ribosa-5-fosfato o fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato.

2.3.3 METABOLISMO DEL GLUCÓGENO (GLUCOGÉNESIS).

Cuando se satisfacen los requisitos de energía de la célula, el exceso de glucosa de la dieta se almacena como glucógeno. La glucosa puede movilizarse a partir del glucógeno cuando se requiere. Un aporte continuo de glucosa es esencial para las funciones vitales del organismo; ya que es el principal combustible de las neuronas, única fuente de energía que pueden emplear las células que carecen de mitocondrias o el músculo esquelético en actividad (durante la glucólisis anaerobia)⁴⁰.

2.3.3.1 DEPÓSITOS DE GLUCÓGENO.

Los principales depósitos de glucógeno se encuentran en el músculo y en el hígado, donde tienen diferentes funciones (tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las funciones del glucógeno hepático y muscular.

Comparación de las funciones del glucógeno hepático y muscular		
Fase 1: Fase de acopio de energía		
	Glucógeno hepático	Glucógeno muscular
Función principal	Mantenimiento de la concentración de glucosa en sangre , en particular tras las comidas y en las primeras fases del ayuno.	Combustible de reserva para la contracción muscular.
Otras funciones	Utilizado como combustible por cualquier tejido ; el hígado contiene glucosa-6-fosfatasa, que elimina el grupo fosfato de la glucosa-6-fosfato, permitiendo que la glucosa abandone el hígado.	Ninguna: no puede abandonar el músculo ; el músculo carece de glucosa-6-fosfatasa, por lo que la glucosa-6-fosfato no puede dejarlo. En vez de ello, entra en la glucólisis para generar energía.
Tamaño de los depósitos	Aproximadamente 10% del peso húmedo del hígado; los depósitos duran sólo unas 12-24 horas durante el ayuno.	Aproximadamente 1-2% del peso húmedo del músculo (sin embargo, los humanos tienen mucho más tejido muscular que hepático, resultando una cantidad doble de glucógeno muscular).
Control hormonal	El glucagón y la adrenalina estimulan la rotura de glucógeno. La insulina estimula la síntesis.	La adrenalina estimula la rotura de glucógeno. La insulina estimula la síntesis.

2.3.3.2 ESTRUCTURA DEL GLUCÓGENO.

El glucógeno es un polímero de moléculas de glucosa ramificadas. Posee dos tipos de uniones entre las moléculas de glucosa⁴⁵ (Fig. 7):

- La mayoría están unidas mediante una unión α -1,4, formando cadenas lineales.
- Cada ocho a doce residuos de glucosa se presenta una unión α -1,6, resultando en puntos de ramificación.

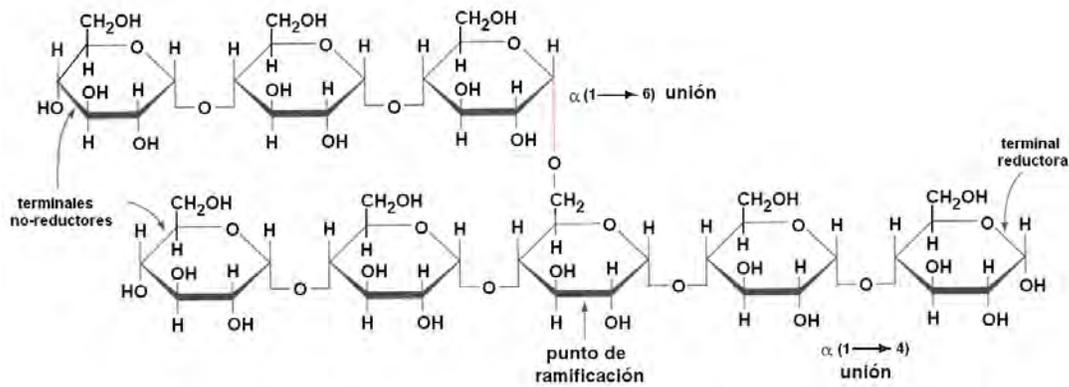


Figura. 7. Estructura ramificada del glucógeno que muestra los dos tipos de unión hallados entre las moléculas de glucosa. La mayoría de las moléculas de glucosa están unidas por enlaces α -1,4 para formar cadenas lineales. Cada 8-12 residuos de glucosa hay una unión α -1,6 facilitando la formación de puntos de ramificación.

El glucógeno se encuentra presente en el citosol en forma de gránulos (el diámetro varía entre 100 y 400 \AA). Además de glucógeno, los gránulos contienen las enzimas que catalizan la síntesis y degradación del mismo y también alguna de las enzimas que regulan estos procesos⁴⁵.

2.3.3.3 SÍNTESIS DEL GLUCÓGENO: GLUCOGÉNESIS.

La síntesis de glucógeno tiene lugar en el citosol celular^{40, 80}. El proceso requiere:

- Tres enzimas: uridina difosfato (UDP)-glucosa pirofosforilasa, glucógeno sintetasa y la enzima ramificadora, amilo (1,4 \rightarrow 1,6) transglucosilasa.
- El donante de glucosa, UDP-glucosa.
- Un cebador para iniciar la síntesis de glucógeno si no hay una molécula de glucógeno preexistente.
- Energía.

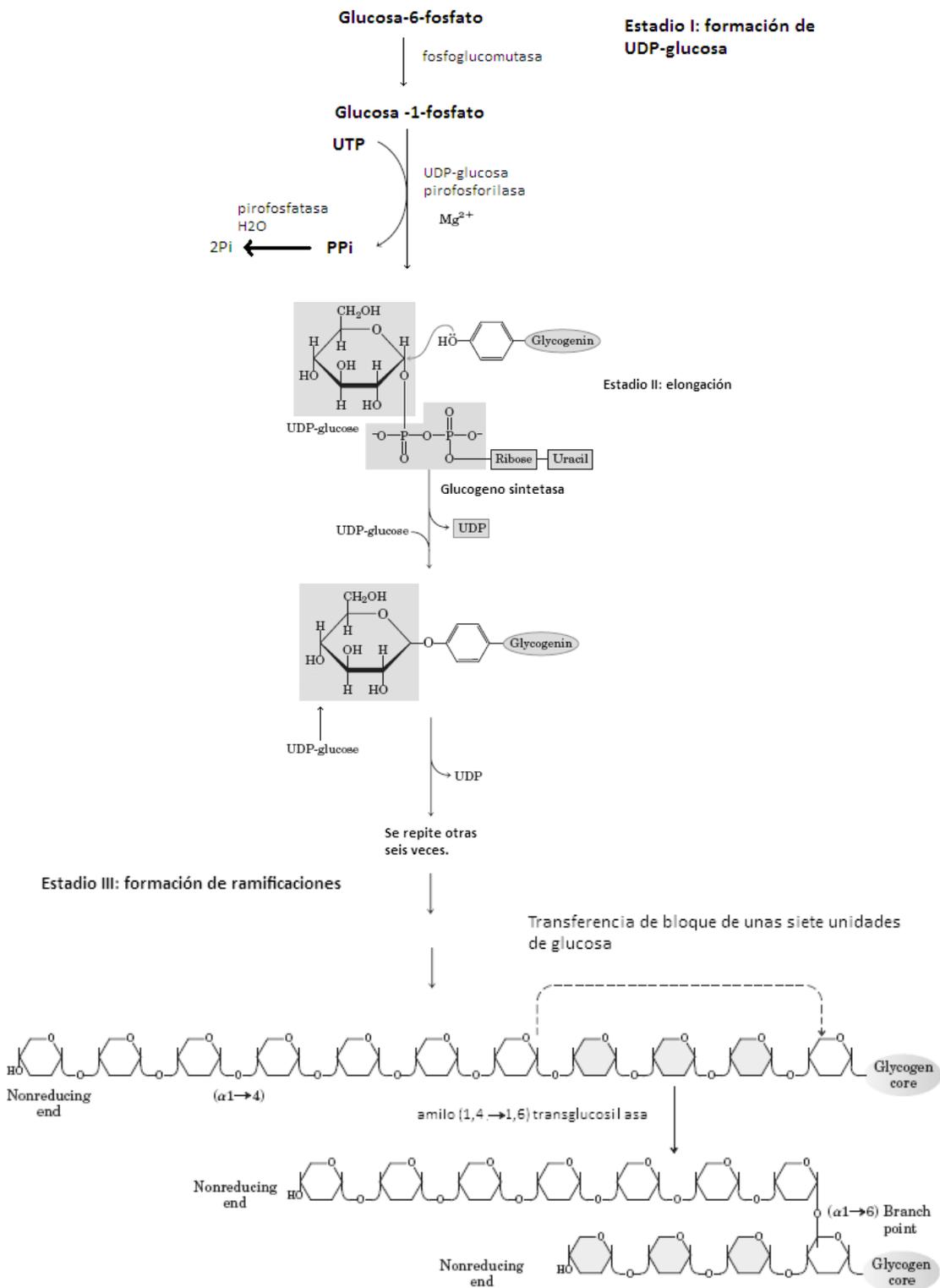


Figura 8. La síntesis de glucógeno consta de tres estadios, comienza con la formación de UDP-glucosa, que a continuación toma parte en la elongación de la molécula de glucógeno en crecimiento. Cuando la cadena en crecimiento es suficientemente larga, se rompe un polisacárido de 5 a 8 unidades, transfiriéndose a una cadena vecina para formar una cadena ramificada.

Existen tres estadios en la glucogénesis^{40, 80} (Fig. 8):

ESTADIO I: Iniciación-formación del donante de glucosa

La UDP-glucosa pirofosforilaza cataliza la síntesis de UDP-glucosa (una forma activada de la glucosa) a partir de glucosa-1-fosfato y uridina trifosfato (UTP). La reacción es reversible, pero es impulsada hacia adelante por la hidrólisis del pirofosfato por la pirofosfatasa.

ESTADIO II: Elongación de la cadena del glucógeno

La glucógeno sintetasa transfiere glucosa de UDP-glucosa al C_{#4} terminal de una cadena de glucógeno existente para formar una unión α -1,4 glucosídica. La enzima sólo puede añadir moléculas de glucosa a una cadena que ya contenga cuatro o más residuos de glucosa, requiere de un cebador. Éste puede ser un fragmento de glucógeno o, en su ausencia, la proteína glucogenina.

ESTADIO III: Formación de ramificaciones

La glucógeno sintetasa sólo forma moléculas de glucógeno de cadena lineal. Para formar ramificaciones se requiere una enzima ramificadora específica llamada amilol (1,4 \rightarrow 1,6) transglucosilasa. Cuando la cadena en crecimiento contiene once o más residuos, ésta enzima transfiere una serie de residuos, normalmente siete, desde el extremo no reductor de la cadena de glucógeno a una cadena vecina, formándose una unión α -1,6, estableciéndose un punto de ramificación.

2.3.3.4 DEGRADACIÓN DEL GLUCÓGENO: GLUCOGENÓLISIS.

La degradación del glucógeno tiene lugar en el citoplasma celular. En la glucogenólisis existen dos estadios⁸⁰ (Fig. 9).

ESTADIO I: Acortamiento de la cadena de glucógeno

La glucógeno fosforilasa cataliza la eliminación secuencial de residuos de glucosa del extremo no reductor del glucógeno. La enzima requiere piridoxal fosfato (PLP) como cofactor. La fosforilasa rompe la unión α -1,4 glucosídica terminal para liberar glucosa-1-fosfato. Este proceso se conoce como fosforólisis, siendo similar a la hidrólisis pero empleando fosfato para romper el puente de unión. La glucosa-1-fosfato puede convertirse en glucosa-6-fosfato, mediante la fosfoglucomotasa, y posteriormente convertirse en glucosa por la glucosa-6-fosfatasa. La fosforilasa continúa degradando glucógeno hasta que alcanza un residuo a cuatro moléculas de distancia de una ramificación.

ESTADIO II: Eliminación de las ramificaciones

Implica dos enzimas: una transferasa ($[\alpha$ -1,4 \rightarrow α -1,4] glucan transferasa), que transfiere los tres residuos glucosa terminales desde una rama exterior a otra exponiendo el punto de ramificación α -1,6; y una enzima desramificadora, la amilo- α -1,6 glucosidasa, que hidroliza la unión α -1,6, para liberar glucosa. Juntas, las dos enzimas convierten la estructura ramificada en otra línea. La glucógeno fosforilasa puede continuar hasta cuatro unidades de distancia del próximo punto de ramificación.

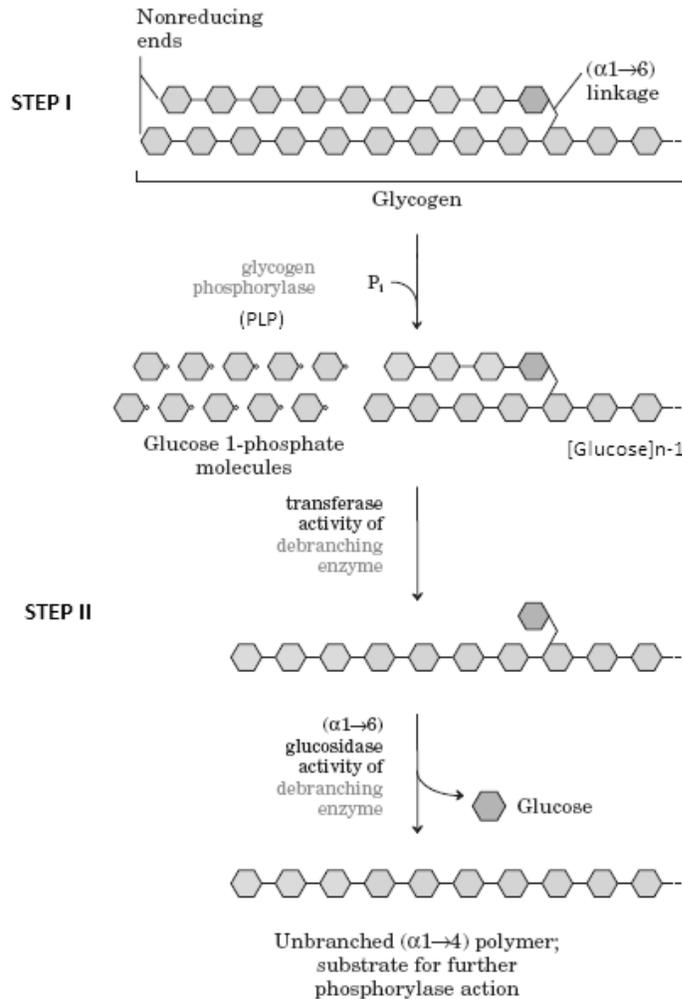


Figura 9. Degradación del glucógeno que muestra los dos estadios necesarios para su catabolismo hasta unidades de monosacáridos. En el estadio 1 (Step I), el acortamiento de la cadena del glucógeno libera glucosa-1-fosfato, la enzima utiliza como cofactor la piridoxal fosfato (PLP). En el estadio 2 (Step II), la glucógeno fosforilasa continúa rompiendo las uniones $\alpha-1,4$ hasta alcanzar un residuo de glucosa, a cuatro residuos de distancia de un punto de ramificación. En este estadio se libera glucosa libre.

2.3.3.5 REGULACIÓN DEL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO.

La regulación de la síntesis y degradación del glucógeno se debe de considerar dos niveles: regulación hormonal y control alostérico^{40, 80}.

Regulación Hormonal.

La glucógeno sintetasa y la glucógeno fosforilasa están reguladas por una fosforilación hormono-dependiente reversible.

La glucógeno fosforilasa existe en dos formas:

- Fosforilasa a, la forma activa, fosforilada.
- Fosforilasa b, la forma inactiva, desfosforilada.

La adrenalina (en el músculo y en el hígado) y el glucagón (sólo en el hígado) estimulan la rotura de glucógeno. Activan la proteín-cinasa A, dependiente del AMPc, que origina la fosforilación de la glucógeno fosforilasa⁸⁰.

La glucógeno sintetasa también existe en dos formas:

- Glucógeno sintetasa a, la forma activa, desfosforilada.
- Glucógeno sintetasa b, la forma inactiva, fosforilada.

La adrenalina y el glucagón son hormonas catabólicas e inhiben la síntesis de glucógeno. Se activa la proteín-cinasa A, dependiente de Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPc), que fosforila la glucógeno sintetasa, inactivándola. Por consiguiente la glucógeno sintetasa y la glucógeno fosforilasa están reguladas de manera recíproca⁴⁰.

La proteín-fosfatasa-1 revierte la fosforilación de la sintetasa y de la fosforilasa del glucógeno, eliminando los grupos fosfato mediante hidrólisis.

La acción de la insulina.

Se trata de una hormona anabólica y estimula la síntesis e inhibe la rotura del glucógeno. La forma en que ocurre es que la insulina activa la enzima fosfodiesterasa, que cataliza la rotura de AMPc a AMP. Un descenso en el AMPc produce una disminución de la actividad de la proteín-cinasa A. Esto produce una

desfosforilación tanto de la glucógeno fosforilasa (inactivándola) como de la glucógeno sintetasa (activándola)^{39, 80}.

El mecanismo de acción de la adrenalina y del glucagón es un ejemplo de una vía de amplificación, en la que el gran número de pasos implicados amplifica la señal hormonal, permitiendo la rápida liberación de glucosa. Sólo una o dos moléculas de la hormona se ligan a sus receptores, pero cada uno produce la activación de una serie de moléculas de proteína-cinasa (100) que, a su vez, activan muchas moléculas de fosforilasa b cinasa (1000). Esto origina un gran número de moléculas de glucógeno fosforilasa activa (10,000) para degradar el glucógeno⁴⁵.

Control Alostérico.

Glucógeno Fosforilasa Hepática.

La glucosa inhibe alostéricamente la glucógeno fosforilasa a hepática. La fosforilasa a (forma activa, fosforilada) contiene dos zonas de unión para la glucosa. La unión de la glucosa produce un cambio de conformación, exponiendo los grupos fosfato, capacitando su eliminación por la proteína-fosfatasa-I y convirtiéndola en glucosa, inhibe la rotura de glucógeno. La glucosa-6-fosfato también inhibe la fosforilasa, pero activa la glucógeno sintetasa¹⁹.

Glucógeno Fosforilasa Muscular.

El principal control alostérico lo realiza el 5'AMP y el Ca^{2+} . Los iones de calcio liberados durante la contracción muscular se ligan a la calmodulina, una subunidad de la fosforilasa b cinasa, activándola. Para que la activación sea máxima la enzima también necesita fosforilación⁴⁷.

El AMP es un indicador de la situación energética de la célula. Niveles elevados de AMP señalan niveles de energía bajos (bajos niveles de ATP), por consiguiente, el AMP activa alostéricamente a la fosforilasa b; esto aumenta la rotura del glucógeno para proporcionar energía para la contracción muscular.

3. HOMEOSTASIA DE LA GLUCOSA.

El nivel plasmático de glucosa es uno de los parámetros más estrechamente regulados, debido, principalmente, a un fino ajuste y regulación entre la captación periférica y la producción hepática de la glucosa obteniendo niveles en ayunas de 60 – 110 mg/dL que se consiguen por los siguientes mecanismos^{54, 56, 71}:

- Regulación hormonal.
- Participación del hígado y tejidos extrahepáticos.
- Regulación enzimática por hormonas y dieta.

La homeostasia de la glucosa puede dividirse en tres estados básicos: posprandial, de ayuno (postabsortivo) y de inanición (Fig. 10). Sin embargo el estado de inanición puede subdividirse en temprano y tardío, dado que los combustibles disponibles dependen del grado de privación de nutrientes (Tabla. 4)^{19, 22, 71}.

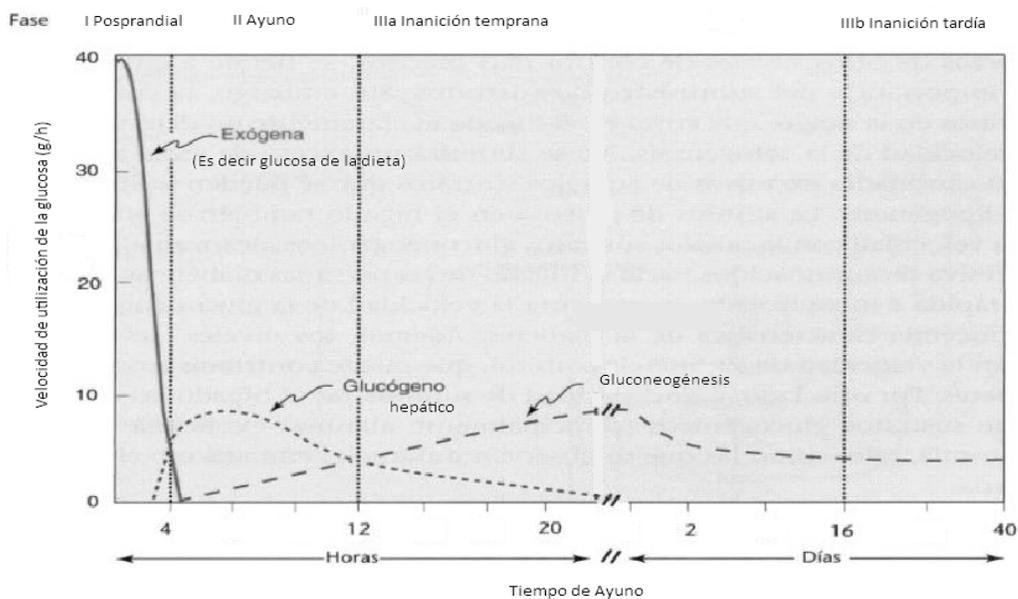


Figura 10. Estados de la homeostasia de la glucosa. La homeostasia puede dividirse en tres estados: **I. Estado posprandial**, la mayoría de la glucosa la proporciona la dieta. **II. Estado de ayunas (postabsortivo)**, la mayoría de la glucosa la proporciona la degeneración de los depósitos de glucógeno hepático. **III. Estado de inanición**, la mayoría de la glucosa proviene de la gluconeogénesis; la degradación de proteínas y grasas proporciona aminoácidos y glicerol, sustratos para la gluconeogénesis. Este último puede subdividirse a su vez en inanición **temprana y tardía**.

Tabla 4. Estados de la homeostasia de la glucosa.

Tres estados de la homeostasia de la glucosa			
Estado	Curso temporal	Principales combustibles empleados	Control hormonal
I posprandial	Tras una comida 0-4 h	La mayoría de los tejidos utilizan glucosa	Aumenta insulina, da lugar a: Aumento de captación de glucosa por tejidos periféricos. Aumento de glucógeno, TG y síntesis de proteínas.
II ayuno (postabsortivo)	4-12 h tras alimentarse	Cerebro: glucosa Músculo e hígado: ácidos grasos	Aumento de glucagón y NA estimula la rotura de glucógeno hepático y TG. Disminuye insulina.
IIIa inanición precoz	12h a 16 días	Cerebro: glucosa y algunos cuerpos cetónicos. Hígado: ácidos grasos. Músculo: principalmente ácidos grasos y algunos cuerpos cetónicos.	Aumento de glucagón y NA, aumento en hidrólisis de TG y cetogénesis. Aumento de cortisol, rotura de proteína muscular, liberando aminoácidos para la gluconeogénesis.
IIIb inanición tardía	> 16 días	Cerebro: utiliza más cuerpos cetónicos y menos glucosa para conservar proteínas. Músculo: sólo ácidos grasos	Aumento de glucagón y NA

(NA, noradrenalina; TG, triacilglicerol)

Estado Posprandial.

Es el período comprendido entre las 0 y las 4 horas después de una ingesta de comida, durante este estado^{22, 39, 56}:

- Un aumento de la glucosa plasmática produce liberación de insulina por las células β del páncreas. La disponibilidad de sustrato y el incremento de la insulina estimulan la síntesis tisular de glucógeno, triacilglicerol y proteínas; por tanto, es un estado anabólico.

- La glucosa es el único combustible para el encéfalo; la captación es independiente de insulina.
- El músculo y el tejido adiposo también utilizan glucosa; la captación por estos tejidos es insulino dependiente.

En un sujeto normal, la absorción intestinal de glucosa no pasa de 1 g/Kg/Hora. Si están presentes en el intestino cantidades mayores, puede producirse diarrea, ya que los monosacáridos en la luz del intestino alcanzan una condición isotónica y el aumento de volumen consiguiente acelera el peristaltismo^{19, 56, 71}.

Un aumento de la glucosa y de la insulina en el hígado activa la glucocinasa. Ésta, a diferencia de la hexocinasa, no es inhibida por la glucosa-6-fosfato, capacitando al hígado a responder a los elevados niveles de glucosa en sangre que se producen tras una ingesta de alimento. La glucocinasa fosforila a la glucosa, que puede usarse para la síntesis del glucógeno hepático, evitando, la hiperglucemia⁴⁰.

La hexocinasa, presente en la mayoría de las células, está operativa a niveles máximos cuando la concentración de glucosa en sangre es baja.

Estado de Ayunas.

Es el período entre 4 y 12 horas tras una comida, es decir, el estado postabsortivo. Durante este estado^{47, 54}:

- La rotura de los depósitos de glucógeno hepático proporciona glucosa para su oxidación por el cerebro. Estos depósitos sólo duran entre 12 y 24 horas.
- La hidrólisis de los depósitos de triacilglicerol libera ácidos grasos, que se utilizan como combustible preferentemente por el músculo y el hígado.
- El músculo también puede emplear como combustible a su propio glucógeno.

Todos estos procesos son activados por el aumento de la proporción entre el glucagón e insulina. Se produce una activación de la glucógeno-fosforilasa y de la lipasa sensible a hormonas por la fosforilación y de la rotura del glucógeno y de la lipólisis.

Estado de Inanición.

Estado de Inanición precoz.

Una vez que se ha utilizado el glucógeno hepático, se requiere un sustrato alternativo que pueda proporcionar glucosa^{34, 56}. En la inanición precoz:

- La noradrenalina y el cortisol activan la degradación de las proteínas musculares, liberándose aminoácidos, en particular alanina y glutamina.
- Hidrólisis de los depósitos de triacilglicerol (tejido adiposo), liberando glicerol.
- La glucosa producida es empleada por el encéfalo.
- Los ácidos grasos liberados a partir del triacilglicerol también los usa el hígado para fabricar cuerpos cetónicos, que pueden ser utilizados por los tejidos periféricos, así como por el encéfalo.

Estado de Inanición Tardío.

Es el período de inanición de más de 16 días, hasta el fallecimiento. En la inanición prolongada la rotura de proteína muscular se enlentece. Esto se debe a que hay una menor necesidad de glucosa por la vía de la gluconeogénesis, ya que el cerebro se adapta a utilizar más cuerpos cetónicos, fenómeno al que contribuye que el músculo utilice como combustible casi exclusivo a los ácidos grasos^{19, 34, 56}.

3.1 FACTORES QUE REGULAN LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE.

El hígado, páncreas y otras glándulas endócrinas intervienen en el control de las concentraciones de glucosa sanguínea en un intervalo reducido. Durante un ayuno breve, la glucosa es suministrada al líquido extracelular (LCE) desde el hígado por gluconeogénesis. Dos hormonas principales controlan la glucosa sanguínea: insulina y glucagon, ambas producidas en el páncreas. Otro tipo de hormonas y sustancias neuroendocrinas también ejercen cierto control sobre las concentraciones de glucosa en sangre^{9, 77}.

La insulina, también llamada agente hipoglucémico, es la hormona primaria a la que se debe la entrada de glucosa en la célula. Es sintetizada por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas. Cuando estas células detectan un incremento en la glucosa plasmática, liberan la insulina. La liberación de insulina causa un mayor movimiento de glucosa en las células y mayor metabolismo de glucosa^{39, 81}.

La insulina se libera cuando las concentraciones de glucosa son altas, esto reduce las concentraciones de glucosa plasmática al incrementar la entrada de transporte de glucosa, por medio de la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 a la membrana celular, en el músculo y el tejido adiposo. También incrementa la glucogénesis, lipogénesis y glucólisis e inhibe la glucogenólisis^{40, 22} (Tabla 5).

El glucagon, también llamado agente hiperglucémico, es la hormona primaria a la que se debe el incremento de las concentraciones de glucosa. Se sintetiza mediante las células α de los islotes de Langerhans en el páncreas y se libera durante estados de estrés y ayuno. Cuando estas células detectan una disminución en la glucosa del cuerpo, liberan glucagon^{19, 71}.

El glucagon incrementa las concentraciones de glucosa plasmática mediante glucogenólisis en el hígado y un incremento en la gluconeogénesis^{13, 42} (Tabla 5).

Tabla 5. Principales efectos de la insulina y del glucagón.

Resumen de los principales efectos de la insulina y el glucagón		
Vía	Insulina: anabólica	Glucagón: catabólico
Metabolismo de los carbohidratos		
Glucógeno	Aumenta la síntesis de glucógeno en músculo e hígado	Aumenta la rotura de glucógeno sólo en el hígado (la NA y la adrenalina aumentan la rotura en músculo)
Glucólisis/ gluconeogénesis	Aumenta la glucólisis	Aumenta la gluconeogénesis
Captación de glucosa	Mayor captación por los tejidos periféricos, no por el hígado	Sin efecto
Vía de la pentosa fosfato	Aumenta PPP, produciendo NADPH para la lipogénesis	—————
Metabolismo de los lípidos		
Lipólisis y β -oxidación	Inhibe	Activa
Síntesis cuerpos cetónicos	Inhibe	Activa
Lipogénesis	Activa	Inhibe
Metabolismo de las proteínas		
Captación de aminoácidos por los tejidos	Aumenta la captación por la mayoría de los tejidos	Aumenta la captación hepática por la gluconeogénesis
Síntesis de proteínas	Aumenta en la mayoría de los tejidos	Disminuye
Degradación de proteínas	Disminuye	Estimula la rotura

NA, noradrenalina; PPP, Vía de las pentosas fosfato.

Dos hormonas que produce la glándula suprarrenal afectan el metabolismo de carbohidratos. La adrenalina, producida por la médula espinal, produce un aumento rápido de la glucosa sanguínea por activación de la fosforilasa y con una disminución de PO_4 en sangre. La adrenalina también eleva el lactato, al

desdoblar el glucógeno muscular, inhibe la secreción de insulina y promueve la lipólisis. La adrenalina se libera durante procesos de estrés^{19, 59}.

Los glucocorticoides, sobre todo cortisol, se liberan de la corteza suprarrenal al estimular la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). El cortisol incrementa la glucosa plasmática al disminuir la entrada intestinal en la célula e incrementar la gluconeogénesis, el glucógeno hepático y la lipólisis^{47, 59}.

Dos hormonas de la hipófisis anterior, hormona del crecimiento y ACTH, promueven el incremento de glucosa plasmática. La hormona de crecimiento incrementa la glucosa al disminuir la entrada de glucosa en las células e incrementar la glucólisis. Su liberación de la hipófisis es estimulada por las concentraciones de glucosa reducidas y se inhibe cuando se incrementa la glucosa. Las concentraciones reducidas de cortisol estimulan la hipófisis anterior para liberar ACTH. La ACTH, a su vez, estimula la corteza suprarrenal para liberar cortisol e incrementar las concentraciones de glucosa plasmática al convertir el glucógeno hepático en glucosa y promover la gluconeogénesis^{19, 30}.

Otras dos hormonas afectan las concentraciones de glucosa: tiroxina y somatostatina. La glándula tiroides es estimulada por la producción de hormona estimulante de la tiroides (TSH) para liberar tiroxina que incrementa las concentraciones de glucosa plasmática al aumentar la glucogenólisis, gluconeogénesis y absorción intestinal de glucosa.

La somatostatina, producida por las células γ de los islotes de Langerhans del páncreas, incrementa las concentraciones de glucosa plasmática mediante la inhibición de insulina, glucagón y hormona del crecimiento⁷¹.

4. PATOLOGÍAS DE LA GLUCOSA EN SANGRE.

4.1 DIABETES MELLITUS.

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos, cuyo nexo en común es la presencia de la hiperglucemia secundaria a un déficit de la

secreción de insulina, a un defecto de su actividad metabólica, o a ambos. La deficiencia en la insulina es resultado de una inadecuada secreción, la disminución de la respuesta de los tejidos a la insulina en uno o varios puntos de la vía de acción de la hormona^{58, 70, 82}.

Los síntomas marcados de la hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia y pérdida de la visión.

4.2 CLASIFICACIÓN.

La DM se clasifica con base en el proceso patógeno que culmina en hiperglucemia, en contraste con criterios previos como edad de inicio o tipo de tratamiento⁴. Las dos categorías amplias de la DM se designan tipo 1 y tipo 2. Los dos tipos de diabetes son antecedidos por una fase de metabolismo anormal de glucosa. La diabetes tipo 1 es resultado de la deficiencia completa o casi total de insulina, y la tipo 2 es un grupo heterogéneo de trastornos que se caracterizan por grados variables de resistencia a la insulina, menor secreción de dicha hormona y una mayor producción de glucosa^{30, 63}.

Tabla 6. Clasificación de la Diabetes Mellitus.

Clasificación etiológica de la diabetes mellitus (ADA 1997, OMS 1998)	
1. Diabetes tipo 1	Dstrucción de células β del páncreas. Deficiencia de insulina absoluta. Autoanticuerpos de células de los islotes, autoanticuerpos de insulina, autoanticuerpos de descarboxilasa de ácido glutámico, autoanticuerpos IA-2 y IA-2B de fosfatasa de tirosina.
2. Diabetes tipo 2	Resistencia a la insulina con un defecto secretorio de insulina. Deficiencia de insulina relativa.
3. Otros tipos específicos de diabetes	Defectos genéticos de la función de las células β . Enfermedad pancreática. Enfermedad endocrina. Inducida por fármacos o sustancias químicas. Infecciones. Otros síndromes genéticos.
4. Diabetes mellitus gestacional	Intolerancia a la glucosa durante el embarazo, debida a cambios metabólicos y hormonales.

Otras causas de DM, Tabla 6, son defectos genéticos específicos de la secreción o acción de la insulina, la diabetes del joven de inicio de la madurez (*maturity onset diabetes of the young*, MODY) es un subtipo de DM que se caracteriza por ser transmitido por herencia autosómica dominante, comienzo precoz de la hiperglucemia (por lo común antes de los 25 años de edad)⁴. Los defectos genéticos de la función de las células β se caracterizan por mutaciones en: factor de transcripción nuclear del hepatocito (HNF) 4α (MODY 1), glucocinasa (MODY 2), HNF- 1α (MODY 3), factor promotor de insulina (IPF-1; MODY 4)⁷⁰.

La DM, también, puede ser el resultado de enfermedades del páncreas exocrino cuando se destruye gran parte de los islotes o se cursa con patologías que afectan al páncreas como fibrosis quística, pancreatitis, hemocromatosis, etc. También puede ser el resultado de endocrinopatías como: acromegalia, hipertiroidismo, síndrome de Cushing³⁰. Puede ser inducida la DM por drogas o fármacos tales como: Pentamidina, Ácido nicotínico, Glucocorticoides, Tiazidas, por infecciones como: rubeola congénita, citomegalovirus y por síndromes genéticos como: síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, etc⁸².

4.2.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1.

Es consecuencia de interacciones de factores genéticos, ambientales e inmunológicos, que culmina en la destrucción autoinmunitaria de las células β del páncreas y la deficiencia de insulina^{4, 30}.

Los individuos con predisposición genética tienen masa normal de células beta en el momento del nacimiento, pero comienza a perderla por destrucción inmunitaria a lo largo de meses o años (Figura 11)⁷⁰.

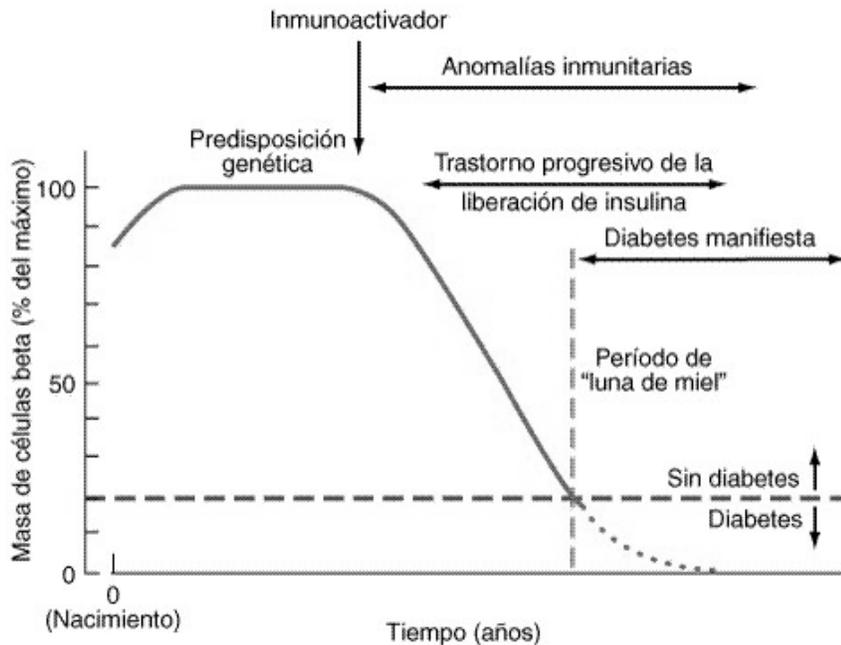


Figura 11. Modelo temporal del desarrollo de la diabetes de tipo 1. Los individuos genéticamente predispuestos están expuestos a un inmunoadivador que inicia un proceso que inicia un proceso autoinmunitario cuya consecuencia es una declinación gradual de la masa de células β . La pendiente de descenso varía de un individuo a otro.

En la mayoría de de los individuos aparecen inmunomarcadores después del suceso desencadenante pero antes de que la enfermedad se manifieste en clínica. Después empieza a declinar la masa de las células beta y se trastorna progresivamente la secreción de insulina, a pesar de mantenerse una tolerancia normal a la glucosa. La velocidad de declive de la masa de células beta es muy variable de un individuo a otro. Las características de la diabetes no se hacen evidentes sino hasta que se ha destruido la mayor parte de las células beta (alrededor del 80%)^{11, 30}.

Consideraciones genéticas.

En la susceptibilidad de la DM de tipo 1 intervienen múltiples genes. El principal gen de predisposición de la DM de tipo 1 se localiza en la región HLA del cromosoma 6 que codifican las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex, MHC*) de clase II. Los

polimorfismos en el complejo HLA de clase II parecen representar el 40 a 50% del riesgo genético de padecer DM del tipo 1³⁰.

La mayoría de los diabéticos de tipo 1 tienen el haplotipo HLA DR3, el HLA DR4, o ambos. Además de la asociación del MHC clase II se sabe que 10 loci genéticos distintos contribuyen a la susceptibilidad de mostrar diabetes de tipo 1 (entre los loci recién identificados están los polimorfismos en la región del promotor del gen de insulina, gen CTLA-4, el receptor de interleucina 2, IFIH1 y P1PN22)⁶⁸. También existen genes que brindan protección contra la aparición y evolución de la enfermedad. El haplotipo DQA1*0102, DQB1*0602 solo se encuentra en menos del 1% de los individuos y al parecer protege contra la enfermedad^{4, 30}.

El peligro que aparezca DM tipo 1 aumenta en parientes de personas con la enfermedad, de 3 a 4% si el progenitor tiene diabetes de tipo 1 y de 5 a 15% en un hermano⁵⁸.

Factores fisiopatológicos.

Las células de los islotes pancreáticos son infiltradas por linfocitos (un proceso denominado insulinitis). Después de la destrucción de las células beta, el proceso inflamatorio remite, los islotes quedan atróficos y desaparecen los inmunomarcadores^{3, 4}. Los estudios sobre insulinitis han identificado las siguientes anomalías:

1. Autoanticuerpos contra células de los islotes.
2. Linfocitos activados en los islotes, ganglios linfáticos peripancreáticos y la circulación generalizada.
3. Linfocitos T que proliferan cuando son estimulados con proteínas de los islotes.
4. Liberación de citocinas en el seno de la insulinitis.

Las células beta parecen ser vulnerables al efecto tóxico de algunas citocinas (factor de necrosis tumoral [TNF- α], interferón gamma e interleucina 1 [IL-1]). Se ignora los mecanismos precisos de la muerte de las células beta, pero puede que participen formación de metabolitos de óxido nítrico, apoptosis y efectos citotóxicos mediados por los linfocitos T CD8+. La destrucción de los islotes es medida por los linfocitos T y no por anticuerpos contra el tejido insular^{11, 30}.

Entre las moléculas del islote pancreático que constituyen objetivos del proceso autoinmunitario se cuenta la insulina, descarboxilasa de ácido glutámico (*glutamic acid descarboxilase* [GAD]), la enzima biosintética del neurotransmisor del ácido aminobutírico gamma (*gamma-aminobutyric acid* [GABA]), ICA-512/IA-2 (con homología con las fosfatasas de tirosina) y fgrina (proteína de los gránulos secretores de insulina)³⁰.

Inmunomarcadores.

Los autoanticuerpos contra las células de los islotes (*islet cell autoantibodies* [ICA]), son una combinación de varios anticuerpos diferentes dirigidos contra moléculas del islote como GAD, insulina e ICA-512/IA-2 y sirven como marcadores del proceso autoinmunitario de la diabetes de tipo 1⁴.

La determinación de los ICA puede ser útil para clasificar e tipo de diabetes como 1 y para identificar individuos no diabéticos con riesgo de padecerla. Los ICA están presentes en la mayoría (> 75%) de los individuos con diagnóstico reciente de DM tipo 1. En 3 a 4% de los familiares de primer grado de los sujetos con DM tipo 1 existe ICA, junto con la presencia de trastornos de la secreción de insulina predicen un riesgo superior a 50% de padecer DM tipo 1 en los cinco años siguientes. Si no existe este trastorno de la secreción de insulina, la presencia de ICA predice un riesgo a cinco años inferior a 25%⁵⁸.

En la actualidad la medición de los ICA en individuos no diabéticos es un instrumento limitado al campo de la investigación, porque no se ha aprobado tratamiento alguno para prevenir la ocurrencia o el avance de la DM tipo 1.

4.2.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2.

La resistencia a la insulina y un déficit relativo de la secreción de la hormona son aspectos centrales del desarrollo de DM tipo 2, ésta forma de diabetes, la cual afecta aproximadamente al 90-95% de las personas que padecen DM^{21, 41}.

Consideraciones genéticas.

La DM tipo 2 posee un fuerte componente genético. La concordancia de la DM tipo 2 en gemelos idénticos se sitúa entre 70 y 90%. Los individuos con un progenitor con DM tipo 2 tienen más riesgo de diabetes⁴¹. En familiares en primer grado no diabéticos de sujetos con DM tipo 2 existe resistencia a la insulina, demostrada por una menor utilización de glucosa por el músculo esquelético. La enfermedad es poligénica y multifactorial porque además de la susceptibilidad genética, factores ambientales (como obesidad, nutrición y actividad física) modulan el fenotipo⁴⁸.

Fisiopatología.

La diabetes mellitus de tipo 2 se caracteriza por una menor secreción de insulina, por resistencia a dicha hormona, por producción excesiva de glucosa por el hígado y por el metabolismo anormal de grasa³⁴.

La obesidad visceral o central es muy frecuente en la diabetes de tipo 2. En etapas iniciales, la tolerancia a la glucosa sigue siendo casi normal, a pesar de la resistencia a la insulina, porque las células beta del páncreas logran la compensación al incrementar la producción de la hormona. Al evolucionar la resistencia a la insulina y surgir hiperinsulinemia compensatoria, los islotes pancreáticos en algunas personas no pueden conservar el estado hiperinsulinémico y en ese momento surge IGT, caracterizado por incremento en los niveles de glucemia posprandial⁷⁰. La disminución ulterior en la secreción de insulina y el incremento de la producción de glucosa por el hígado culmina en la diabetes franca con hiperglucemia en el ayuno (Figura 12)³⁰.

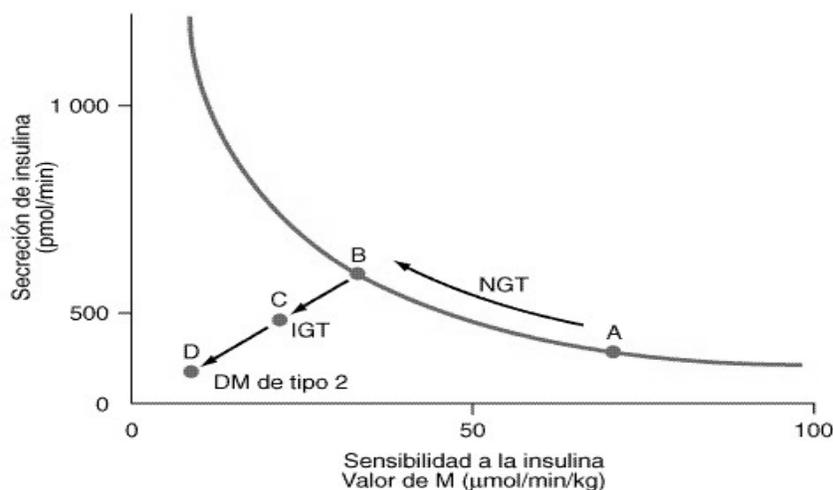


Figura 12. Cambios metabólicos que ocurren durante el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2. La secreción de insulina y la sensibilidad de ésta se encuentran relacionados, conforme el individuo se hace más resistente a la hormona (al pasar del punto A al punto B) se incrementa su secreción. La incapacidad de compensar el problema da por resultado trastorno de la tolerancia a la glucosa y en última instancia DM tipo 2.

Anormalidades metabólicas.

Un signo notable de la DM de tipo 2 es la resistencia a la insulina, que es la mejor capacidad de la hormona para actuar eficazmente en los tejidos destinatarios (músculo, hígado y grasa) y es consecuencia de una combinación de susceptibilidad genética y obesidad^{26, 41}.

La resistencia a la acción de la insulina altera la utilización de la glucosa por los tejidos sensibles a insulina y aumenta la producción hepática de glucosa; ambos efectos contribuyen a la hiperglucemia de la diabetes. En el músculo esquelético existe un trastorno mayor del uso no oxidativo de la glucosa (formación de glucógeno). La utilización de la glucosa por los tejidos independientes de la insulina no está alterada en la DM tipo 2^{4, 21}.

En la diabetes de tipo 2 los niveles de receptor de insulina y de actividad de cinasa de tirosina están disminuídos, se cree que en la resistencia a la insulina el factor predominante lo constituyen los defectos posteriores al receptor, el defecto en las señales de cinasa de PI-3 puede disminuir la traslocación de GLUT4 a la

membrana plasmática⁷⁰. Otra anomalía comprenden la acumulación de líquido dentro de miocitos de fibra estriada que puede disminuir la fosforilación oxidativa mitocondrial y disminuir la producción de ATP mitocondrial estimulada por insulina. La menor oxidación de ácidos grasos y la acumulación de lípidos dentro de los miocitos pueden generar especies de oxígeno reactivas como peróxido de lípido⁷².

La obesidad que acompaña a la DM de tipo 2, particularmente la obesidad central o visceral, según se piensa, es una parte del proceso patógeno la mayor masa de adipocitos hace que aumenten los niveles de ácidos grasos libres. Las adipocinas, además de regular el peso corporal, el apetito y el gasto de energía, también modulan la sensibilidad a la insulina³⁰. La mayor producción de ácidos grasos libres y de algunas adipocinas puede causar resistencia a la insulina en músculo estriado y en el hígado, esto es porque los ácidos grasos disminuyen la utilización de glucosa por parte de los músculos de fibra estriada, estimulan la producción de glucosa en el hígado y disminuyen la función de las células beta, en la obesidad disminuye la producción de adiponectina por parte de los adipocitos, que es un péptido insulinosensible, y ello podría contribuir a la resistencia a la insulina, por parte del hígado⁷³.

4.3 COMPLICACIONES AGUDAS DE LA DIABETES MELLITUS.

La cetoacidosis diabética (*diabetic ketoacidosis*, DKA) y el estado hiperosmolar hiperglucémico (*hyperglycemic hyperosmolar state*, HHS) son complicaciones agudas de la diabetes. La DKA ocurre tanto en DM tipo 1 como tipo 2, siendo más frecuente en DM tipo 1. EL HHS se observa de manera primordial en individuos con DM tipo 2. Ambos trastornos se acompañan de deficiencia de insulina absoluta o relativa, depleción de volumen intravascular y anomalías del equilibrio acidobásico^{12, 30}.

La DKA es el resultado de déficit de insulina combinado con exceso de hormonas antagonistas (glucagón, catecolaminas, cortisol y hormona del crecimiento). El descenso de la proporción entre insulina y glucagón incrementa la gluconeogénesis, glucogenólisis y formación de cuerpos cetónicos en el hígado⁴¹.

La combinación de déficit de insulina e hiperglucemia disminuye las concentraciones de fructosa-6-fosfato. El exceso de glucagón disminuye la actividad de la piruvatocinasa, mientras el déficit de insulina aumenta la actividad de la carboxicinasa de fosfoenolpiruvato. Estas alteraciones hepáticas desplazan la manipulación del piruvato hacia la síntesis de glucosa. La deficiencia de insulina reduce las concentraciones de GLUT-4, lo que trastorna la captación de glucosa por el músculo esquelético y el tejido graso y reduce el metabolismo intracelular de la glucosa³⁰.

La cetosis es el resultado de un incremento notable de los ácidos grasos libres procedentes de los adipocitos, con el resultado de un desplazamiento hacia la síntesis hepática de los cuerpos cetónicos. El descenso de los valores de insulina, combinados con elevaciones de catecolaminas y hormona del crecimiento, aumenta la lipólisis y la liberación de ácidos grasos libres¹². En la DKA la hiperglucagonemia altera el metabolismo hepático favoreciendo la formación de cuerpos cetónicos, éstos se encuentran en forma de cetoácidos, que son neutralizados por bicarbonato. Al agotarse los depósitos de bicarbonato sobreviene la acidosis metabólica. A ella contribuye también el aumento de la producción de ácido láctico y el incremento de los ácidos grasos libres aumenta la producción hepática de lipoproteínas de baja densidad (VLDL)³⁰.

En el estado hiperosmolar hiperglucémico, el déficit relativo de insulina y el aporte insuficiente de líquidos son las causas que subyacen al HHS. El déficit de insulina aumenta la producción hepática de glucosa por el músculo esquelético. La hiperglucemia induce una diuresis osmótica que provoca disminución del volumen intravascular, que se exagera más por el aporte insuficiente de líquidos^{18, 30}.

4.4 COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES MELLITUS.

Las complicaciones crónicas de la DM pueden afectar muchos órganos y son causa de gran parte de la morbilidad y mortalidad. Las complicaciones pueden dividirse en vasculares y no vasculares (Tabla 7)⁵⁷.

Tabla 7. Complicaciones crónicas.

Complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus	
Microvasculares	Enfermedades oculares, Retinopatías (no proliferativa y proliferativa), edema de la mácula, neuropatías y nefropatías.
Macrovasculares	Arteriopatía coronaria, enfermedad vascular periférica, enfermedad vascular cerebral.
Otras	Del tubo digestivo (diarrea, gastroparesia), genitourinarias (uropatías y disfunción sexual), dermatológicas, infecciosas, cataratas, glaucoma, enfermedad periodontal.

El riesgo de las complicaciones crónicas aumenta con la duración de la hiperglucemia; suelen hacerse evidentes en el transcurso del segundo decenio de la hiperglucemia. Como la DM tipo 2 puede tener un periodo prolongado de hiperglucemia asintomática, muchos individuos presentan ciertas complicaciones^{29, 81}.

5. MEDICION DE GLUCOSA EN SANGRE.

La glucosa se puede medir del suero, plasma o sangre total. En la actualidad, la mayor parte de las mediciones de glucosa se realizan en suero o plasma, esto es porque la concentración de glucosa en sangre total es alrededor de 15% más baja que la concentración de glucosa en suero o plasma^{1, 9, 70}.

El suero o plasma se debe refrigerar y separar de las células en un plazo no mayor a una hora para evitar la pérdida sustancial de glucosa por fraccionamiento celular. La glucosa de un ayuno se debe obtener después de un ayuno de 8 a 10 horas. También se puede cuantificar glucosa del líquido cefalorraquídeo, saliva, lágrimas, líquido linfático y la orina, pero las mediciones de glucosa en orina no se emplean para el diagnóstico de diabetes, sólo para propósito de monitoreo⁴⁴.

La capacidad de la glucosa para funcionar como un agente reductor ha sido útil en la detección y cuantificación de carbohidratos en líquidos corporales. La glucosa y

otros carbohidratos (hexosas) son capaces de reducir los iones cúpricos en disolución alcalina a iones cuprosos. La disolución pierde su color azul intenso y se forma un precipitado rojo de óxido cuproso. Los reactivos de Benedict y Fehling, que contienen una solución alcalina de iones cúpricos estabilizados por citrato o tartrato, respectivamente, han sido utilizados para detectar agentes reductores en orina y líquidos corporales^{9, 31}.

Otra característica química que se aprovecha para cuantificar carbohidratos es la capacidad de estas moléculas para formar bases de Schiff con aminas aromáticas. La O-toluidina en una disolución ácida caliente producirá un compuesto coloreado con una absorbancia máxima a 630 nm. La galactosa, una aldohexosa y la manosa, una aldopentosa, reaccionarán también con O-toluidina y producirán un compuesto coloreado que puede interferir con la reacción⁴⁴.

En los métodos más comunes de análisis de glucosa se emplean las enzimas oxidasa de glucosa o hexocinasa (Tabla 8).

Tabla 8. Métodos de medición de glucosa.

METODOS DE MEDICIÓN DE GLUCOSA	
Glucosa oxidasa	$\text{Glucosa} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Glucosa oxidasa}} \text{ácido glucónico} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{cromógeno reducido} \xrightarrow{\text{peroxidasa}} \text{cromógeno oxidado} + \text{H}_2\text{O}$
Hexocinasa	$\text{Glucosa} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{hexocinasa}} \text{glucosa-6-fosfato} + \text{ADP}$ $\text{Glucosa-6-p} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G-6-P deshidrogenasa}} \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{6-fosfogluconato}$
Clinitest	$\text{Sustancia reductora} + \text{Cu}^{2+} \longrightarrow \text{Cu}_2\text{O}$

El método Clinitest es una modificación de Benedict⁹.

La glucosa oxidasa es la enzima más específica que reacciona sólo con β-D-glucosa. La glucosa oxidasa transforma a la β-D-glucosa en ácido glucónico, se consume oxígeno y se produce peróxido de hidrógeno^{9, 44}.

La peroxidasa de rábano se emplea para catalizar la segunda reacción, y el peróxido de hidrógeno se emplea para oxidar un compuesto colorido. Dos cromógenos de uso común son la hidrazona de 3-metil-2-benzotiazolinona y la N,N-dietilanilina. El cambio de absorbancia se puede monitorear espectrofotométricamente y es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra^{2, 38}.

Las concentraciones altas de ácido úrico, bilirrubina y ácido ascórbico pueden causar valores reducidos falsos como resultado de que la peroxidasa oxida a estas sustancias, lo que evita la oxidación y detección del cromógeno. Los oxidantes fuertes (blanqueador), causan valores altos falsos^{31, 44}.

Se considera que el método de hexocinasa es más exacto que los métodos de glucosa oxidasa porque la reacción de acoplamiento con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es muy específica; por tanto, tiene menos interferencia que el procedimiento de glucosa oxidasa³⁸.

La hexocinasa en presencia de ATP convierte la glucosa en glucosa-6-fosfato, y el cofactor NADP⁺ convierte a la glucosa-6-fosfato en 6-fosfogluconato y NADPH mediante glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El NADPH tiene un máximo de absorbancia a 340nm y al monitorizarse por medio de un espectrofotómetro es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra^{44, 76}.

6. ANTECEDENTES.

La Diabetes mellitus ha mostrado incremento progresivo de su incidencia y prevalencia en el mundo, especialmente en el continente americano^{20, 21}. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula el número de personas con diabetes en el mundo es de 171 millones, convirtiéndose en un problema de salud pública importante debido a los altos costos de su tratamiento y de la prevención de las complicaciones^{32, 49}.

El conocimiento de la Diabetes se menciona desde la antigüedad en el papiro de Ebers (1550 A. de C.), desde entonces la importancia de la medición de glucosa

en los fluidos corporales a tomado importancia para la prevención, diagnóstico y tratamiento de ésta enfermedad. Desde los descubrimientos de John Rollo, con respecto a los niveles de glucosa en sangre, se generan ciertos avances en los laboratorios en cuanto a la determinación de glucosa en sangre³⁶.

En 1965, la compañía AMES, división de la corporación de laboratorios Miles, actualmente conocida como Bayer, desarrolla e introduce al mercado un producto llamado Destrostix. El producto fue inventado por Ernie Adams en 1963, el cual estaba destinado a las clínicas extra-hospitalarias³³. El aparato utilizaba tiras reactivas de papel, las cuales se le agregaba una gota de sangre capilar, desarrollando un color azul, con el cual podían comparar el mismo a una escala colorimétrica, proporcionando un valor aproximado de los niveles de glucosa en sangre³⁶. El producto se consideró como un análisis semi-cuantitativo, ya que dependiendo de factores visuales, como la intensidad de luz, daba un margen de error considerable³².

En 1970 aparecieron los primeros medidores de glucosa que ofrecían resultados cuantitativos basados en métodos fotométricos simples los cuales detectaban los cambios de color producidos por indicadores presentes en un soporte sólido (tiras reactivas), logrando por medio del lavado y secado de la tira el análisis final, esto implicaba por tanto un alto grado de manipulación por parte del personal de salud o del paciente^{61, 62}. Los medidores evolucionaron hacia sistemas más sencillos los cuales evitaban los pasos de lavado y de secado. Estos sistemas, basados en técnicas fotométricas han sido sustituidos paulatinamente por otros métodos más eficientes⁵⁰.

En la actualidad la mayoría de los glucómetros utilizan tiras reactivas que se basan en un método electroquímico; es decir, lleva incorporados electrodos que proporcionan una corriente de electrones proporcional a la cantidad de glucosa oxidada presente en una muestra de sangre⁶¹.

El método electroquímico se realiza por medio de iones electrolíticos, la migración del ión sodio (Na^+), hacia el cátodo del sensor induce un flujo electrosmótico hacia

este electrodo, resultando en la extracción de glucosa en el cátodo. La concentración de glucosa es medida por un biosensor. La selectividad biológica en este biosensor está en la enzima glucosa oxidasa (GOD) la cual cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es detectado por una reacción de oxidación electrocatalítica en un platino contenido en el electrodo en el sensor, donde es producida una corriente eléctrica y generando oxígeno^{50, 61}.

7. JUSTIFICACIÓN

En México, desde el punto de vista del Sistema Único de información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE), la diabetes es una enfermedad de salud pública que afecta a todas las clases sociales²⁰. Desde 1940 la diabetes ya se encontraba dentro de las primeras 20 causas de mortalidad con una tasa de 4.2 por 100,000 habitantes, a partir de 1970 las consecuencias de la enfermedad ha estado en aumento, llegando a ser, en nuestros días, una de las diez primeras causas de mortalidad en el país, incrementándose la tasa de mortalidad en 61.8 por 10,000 habitantes para mujeres y de 51.6 por 100,000 habitantes para hombres^{20, 21}. Esto se debe a factores como estilo de vida sedentaria, obesidad, uso inmoderado de tabaco, alcohol, alimentación alta en grasas saturadas y carbohidratos simples. Según estos datos, estamos frente a una de las enfermedades que más atención requieren, por su alto índice de crecimiento en la población mexicana^{68, 76}.

Para el control y prevención de ésta enfermedad, las instituciones de salud recomiendan diferentes estrategias de cuidados realizados en otros países, donde se ha tenido éxito. Entre las sugerencias que se recomiendan está el monitoreo de la concentración de glucosa, dieta y ejercicio^{1, 6}.

El diagnóstico de diabetes por lo general es tardío. Casi un 50% de las personas desconocen su condición varios meses o años y grandes porcentajes de pacientes recién diagnosticados presentan complicaciones como retinopatías (16-21%), nefropatías (12-23%) y neuropatías (25-40%)^{27, 41}.

Las mejoras en el conocimiento y cuidado de la diabetes han ido siempre muy paralelas al desarrollo técnico de cómo medir la glucosa⁴. Con el paso de los años se han desarrollado técnicas más rápidas y menos invasivas para el control de la diabetes, como la creación de los glucómetros. Según el Instituto Nacional Americano de Salud para el Control del Diabético y Determinación de las Complicaciones y la Asociación Americana de Diabetes (ADA), consideran el uso apropiado de los glucómetros comerciales en casos de urgencia y emergencia, así como en el autocontrol de la diabetes, para reducir las complicaciones a corto y largo plazo tanto en la consulta externa como en el hogar del paciente^{10, 23, 60}.

En muchas instituciones de México se han utilizado los glucómetros para el análisis de la glucemia en los pacientes diagnosticados con diabetes mellitus^{60, 68}.

El uso en nuestro país de los glucómetros es cada vez mayor para el autocontrol de los pacientes diabéticos e incluso al ser métodos cómodos y rápidos se han comenzado a utilizar en centros de salud para mediciones rutinarias y como métodos para el control de la glucemia^{20, 49}.

Debido al aumento del uso de los glucómetros, se justifica realizar un estudio para conocer la validez en los resultados que se obtienen por los glucómetros, siendo un aspecto de alto interés en la práctica clínica. La valoración de los glucómetros en los laboratorios clínicos es un aspecto poco estudiado y es de gran importancia conocer la confiabilidad en los resultados obtenidos por los glucómetros y sus ventajas al ser utilizados dentro de los laboratorios clínicos.

7.1 HIPOTESIS.

- Si los glucómetros comerciales son fabricados para detectar y controlar la glucemia de diabéticos, entonces, pueden ser utilizados dentro de un laboratorio clínico para realizar pruebas rápidas de medición de glucosa.

7.2 OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar la validez de dos glucómetros comerciales para su utilización en un laboratorio clínico.

7.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Comparar los resultados obtenidos por los glucómetros comerciales con los resultados obtenidos por la técnica enzimática de glucosa GOD-PAD, utilizada en el laboratorio clínico.
- Evaluar las ventajas y desventajas que pueden presentarse al utilizar los glucómetros comerciales al analizar las muestras.

7.3 TIPO DE INVESTIGACIÓN.

Se realizó una investigación prospectiva, transversal y descriptiva.

El trabajo se realizó en el laboratorio de análisis clínicos Felipe Semmelweis en Cuernavaca, Estado de Morelos. El material biológico empleado fue sangre venosa proveniente de pacientes que se presentaron en las instalaciones del laboratorio para análisis de glucosa en sangre. El tamaño de la muestra fue de 70 casos, en los cuales, se realizaron tres mediciones, por cada muestra, para su análisis. Las mediciones se llevaron a cabo por cada uno de los dos glucómetros portátiles sometidos a estudio: OpXc y AcCh, y por el análisis de glucosa en sangre que realiza el laboratorio (Método enzimático de glucosa GOD-PAD por colorimetría de N,N-Dietilnilina-4-Aminoantipirina).

7.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

7.4.1 SÍNTESIS DEL PROYECTO.

El objetivo principal de este trabajo es el evaluar la validez de dos glucómetros comerciales (OpXc y AcCh) para su uso, como una prueba rápida, en el análisis de glucosa en sangre de rutina de un laboratorio clínico; para lograr este objetivo los resultados obtenidos por ambos glucómetros se han de comparar con la

técnica enzimática GOD-PAD por colorimetría de N,N-Dietilnilina-4-Aminoantipirina, ésta técnica es utilizada en el laboratorio para el análisis de glucosa en sangre.

8. MATERIAL Y METODOS.

8.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

El material biológico utilizado fueron muestras de sangre de pacientes que acudieron al laboratorio de análisis clínicos “Felipe Semmelweis”, en Cuernavaca, Morelos. Para la obtención de las muestras fue utilizando el sistema VACUTAINER, siguiendo el protocolo para la obtención de muestras de sangre. Se incluyó un total de 70 casos proporcionados por el laboratorio.

Como control interno se emplearon soluciones estándar de glucosa a 300 mg/dl, 100 mg/dl, 75 mg/dl y 45 mg/dl para realizar la curva patrón de glucosa.

Los protocolos empleados en éste proyecto fueron: Protocolo de Toma de Muestra Sanguínea, Sangre Venosa, Protocolo del Glucómetro Comercial OpXc, Protocolo del Glucómetro Comercial AcCh y Protocolo de Determinación de Glucosa en Sangre, Método Enzimático por Colorimetría de N,N-Dietilnilina-4-Aminoantipirina, (Ver Anexo.)

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Las variables a comparar en este estudio son los valores que se obtienen por medio de los glucómetros comerciales y por el método utilizado en el laboratorio para la determinación de glucosa en sangre.

Hipótesis nula (H_0) Las medias de la concentración de glucosa (mg/dL), de los glucómetros comerciales en evaluación son iguales a la media que se obtiene por el método de laboratorio. Hipótesis alterna (H_1) Las medias, de la concentración de glucosa en sangre, obtenidas por cada uno de los glucómetros comerciales en evaluación

son diferentes que la media que se obtiene por el método de laboratorio.

9.1 PRUEBA ESTADÍSTICA.

Los datos fueron analizados, utilizando SPSS Data Editor para Windows, versión 10.0, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Los datos se organizaron mediante tablas, donde se calculó el número de intervalos de clase y su frecuencia para los datos obtenidos. A partir de ésta información se construyó una tabla de frecuencias y se construyeron sus respectivos histogramas, para cada conjunto de datos, con el objeto de conocer la distribución que presentan.

A la información obtenida se le aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para conocer el tipo de distribución que presentan cada conjunto de datos.

De igual manera para cada conjunto de datos se calculó sus medidas de tendencia central y de dispersión para ayudar en la descripción estadística de los mismos.

Con la finalidad de establecer las diferencias entre las medias de los datos obtenidos por los diferentes técnicas, la prueba que se utilizó fue la prueba estadística de Freedman y, para determinar la correlación que existe entre las diferentes técnicas se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

9.2 REGLA DE DECISIÓN.

Si la probabilidad determinada, es menor a 0.05, se rechaza H_0 . En caso contrario, se acepta H_0 .

10. RESULTADOS.

Para decidir la prueba estadística que permite determinar si existen diferencias entre los métodos utilizados, en este proyecto, para la determinación de glucosa en sangre, se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov con un $\alpha = 0.05$. Esta prueba proporciona información útil para conocer que tipo de distribución esta presentando el conjunto de datos obtenidos. Para los glucómetros comerciales, OpXc y AcCh, y para el laboratorio de referencia se obtuvo un valor de $p < 0.00001$, ver: tabla 9. El valor que se obtuvo indica que los datos no se ajustan a una distribución normal por lo que se optó utilizar pruebas estadísticas no paramétricas.

Tabla 9.

PRUEBA DE BONDAD DE AJUSTE DE KOLMOGOROV-SMIRNOV DE UNA MUESTRA APLICADA EN LOS VALORES DE GLUCOSA EN SANGRE (mg/dL) OBTENIDOS POR DOS GLUCOMETROS COMERCIALES Y POR EL LABORATORIO.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov de una muestra			
	OpXc	AcCh	Laboratorio
N	70	70	70
Media (mg/dL)	133.54	134.07	134.93
Desv. STD.	66.72	67.61	69.56
Kolmogorov-Smirnov Z	2.179	2.576	2.41
Asymp. Sig. (2-colas)	0	0	0.0000181

N: Tamaño de la muestra

El histograma de cada uno de los métodos utilizados muestra un sesgo positivo, o sesgados a la derecha, esto quiere decir que la distribución de los valores no es simétrica y por lo tanto es no paramétrica, ver: figura 13.

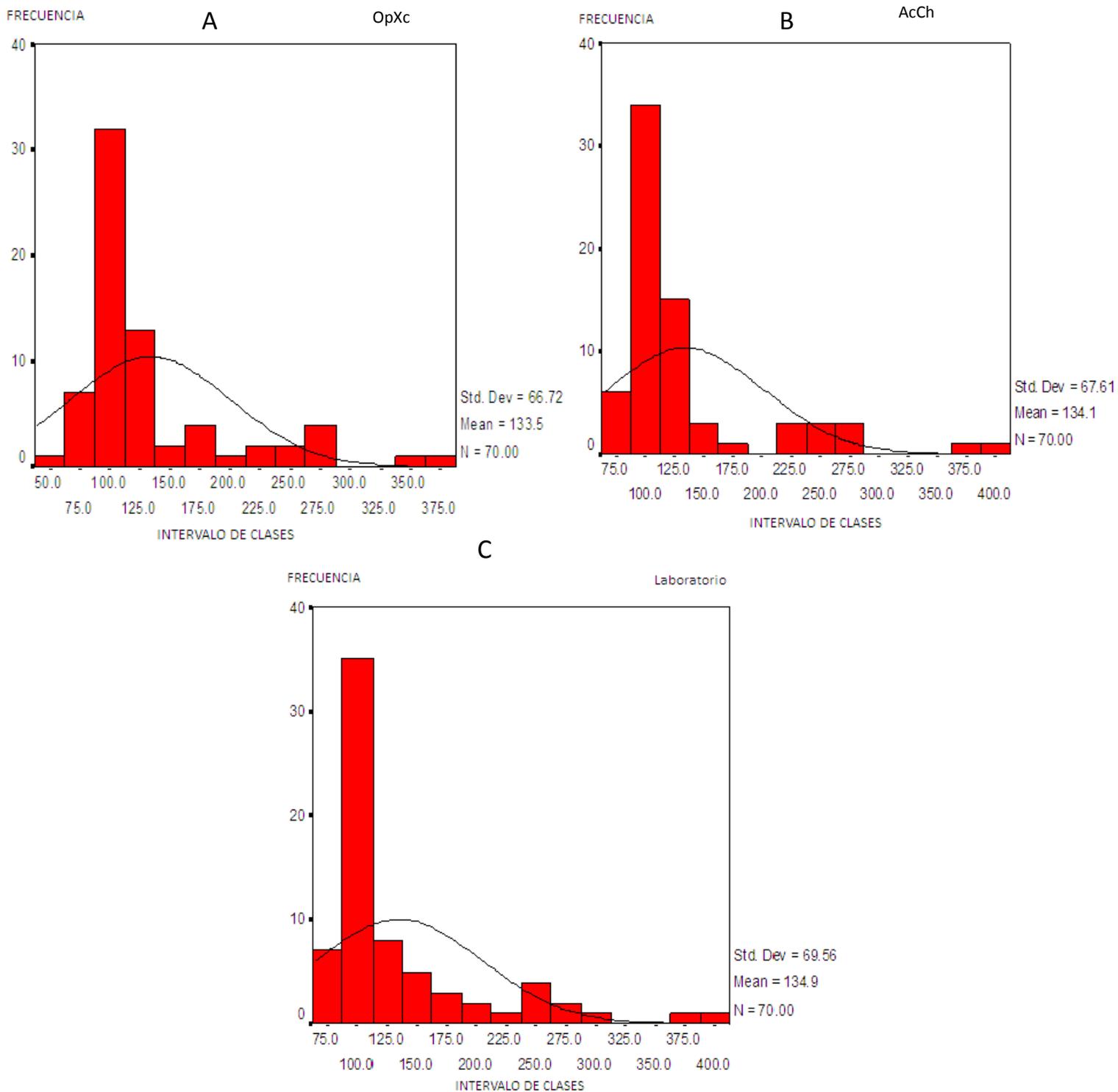


Figura 13. A) Histograma de los valores de glucosa en sangre, en mg/dL, obtenidos por el glucómetro comercial OpXc. **B)** Histograma de los valores de glucosa en sangre, en mg/dL, obtenidos por el glucómetro comercial AcCh. **C)** Histograma de los valores de glucosa en sangre en mg/dL, obtenidos por el método enzimático de glucosa GOD-PAD por colorimetría de N,N-Dietilanilina-4-Aminoantipirina utilizado en el laboratorio. A partir de 70 muestras.

La determinación de la concentración de glucosa en sangre (mg/dL) de las 70 muestras, mediante el uso de tres métodos diferentes (OpXc, AcCh y Método enzimático GOD-PAD) con respecto a las medidas de tendencia central muestra que los valores obtenidos de las medias de cada método son similares, siendo el valor del laboratorio el más alto, ver: tabla 10.

Tabla 10.

MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL DE LOS VALORES DE GLUCOSA EN SANGRE (mg/dL) OBTENIDOS CON LOS GLUCÓMETROS Y CON EL LABORATORIO.

Método	Media	Mediana	Moda
OpXc	133.54	95	96
AcCh	134.07	104	104
Laboratorio	134.92	97	97

Datos expresados en mg/dL.

El rango proporciona información acerca de la dispersión que presentan el conjunto de valores de cada método utilizado. Los resultados del rango del laboratorio se ubican en medio de los dos valores del rango de los dos glucómetros, siendo el valor de rango del glucómetro OpXc el más bajo, con menos dispersión, y el valor de AcCh el más alto, siendo el método con mayor dispersión en los datos.

En los valores de desviación estándar de los tres métodos se observa que la desviación estándar obtenida por el laboratorio es mayor que las desviaciones estándar de los glucómetros comerciales, esto quiere decir que las muestras que se analizaron con los tres métodos provienen de una población heterogénea. De igual manera los valores de coeficiente de variación (C.V.) de los tres métodos son altos, siendo el valor del laboratorio el más alto. En un análisis del coeficiente de

variación de cada uno de los datos, obtenidos por los tres glucómetros comerciales y por el laboratorio, se observa que en un 70% de los valores muestran un C.V. menor al 5%, ver: tabla 11.

Tabla 11.

MEDIDAS DE DISPERSIÓN DE LOS VALORES DE GLUCOSA EN SANGRE OBTENIDOS CON LOS GLUCÓMETROS Y CON EL LABORATORIO.

Método	Valor		Rango	Var.	D.E.	Sesgo	C.V.
	Máximo	mínimo					
OpXc	369	60	309	4451.74	66.72	1.73	49.9
AcCh	404	74	330	4571.74	67.61	1.33	50.4
Laboratorio	400	79	321	4830.73	69.56	1.63	51.6

Datos expresados en mg/dL, Var.: varianza, D.E.: Desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación.

En virtud de haber obtenido una $p < 0.05$ con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para los datos de los tres métodos (tabla 9), la prueba estadística que se utiliza para analizar las diferencias entre los valores de concentración de glucosa en sangre, obtenidos por los tres métodos, es la prueba de Friedman para datos no paramétricos, ver: tabla 12.

Tabla 12.

PRUEBA DE FRIEDMAN PARA LOS DATOS OBTENIDOS CON LOS GLUCOMETROS COMERCIALES COMPARADOS CON LOS DATOS OBTENIDOS POR EL LABORATORIO.

Prueba Estadística de Friedman			
OpXc vs Laboratorio		AcCh vs Laboratorio	
N	70	N	70
Chi-Cuadrada	0.014	Chi-Cuadrada	1.209
Df	1	df	1
Asymp. Sig.	0.904	Asymp. Sig.	0.272

En ésta prueba se comparan los valores de glucosa obtenidos por cada uno de los glucómetros comerciales, utilizados en el trabajo experimental, con los valores de glucosa obtenidos por el laboratorio de referencia.

Al comparar los valores de OpXc con los del laboratorio el resultado que se obtiene con la prueba es $p = 0.904$, esto indica que no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos por el glucómetro OpXc y con los valores del laboratorio. Se compararon, de igual manera, los valores del segundo glucómetro AcCh con los valores del laboratorio. El resultado que se obtiene es $p = 0.272$, esto indica que no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos por el glucómetro AcCh y con los valores del laboratorio.

Para observar qué correlación tienen los valores de cada uno de los glucómetros comerciales con los valores del laboratorio se utiliza el coeficiente de correlación de Spearman. El resultado que se obtiene de la comparación de los valores obtenidos por OpXc con los valores obtenidos por el método del laboratorio es una $p = 0.976$, y el resultado de la comparación de los valores obtenidos por AcCh con los valores obtenidos por el método del laboratorio es una $p = 0.975$. Estos valores indican que existe una muy buena correlación y refuerzan los resultados que se obtuvieron con la prueba de Friedman en que no existe diferencia significativa, Ver: tabla 13.

Tabla 13.

CORRELACIÓN DE MUESTRAS APAREADAS DE LOS DATOS OBTENIDOS POR LOS GLUCÓMETROS Y COMPARADOS CON LOS DATOS OBTENIDOS POR EL LABORATORIO.

Correlación de muestras apareadas				
		N	Correlación	Sig.
Par 1	OpXc vs Laboratorio	70	0.976	0
Correlación de muestras apareadas				
		N	Correlación	Sig.
Par 1	AcCh vs Laboratorio	70	0.975	0

Para representar gráficamente la diferencia de los valores de cada uno de los glucómetros y el del laboratorio se puede observar que los valores de cada uno de los glucómetros, de las 70 muestras, se encuentran cerca de los valores del laboratorio, ver: figuras 14 y 15.

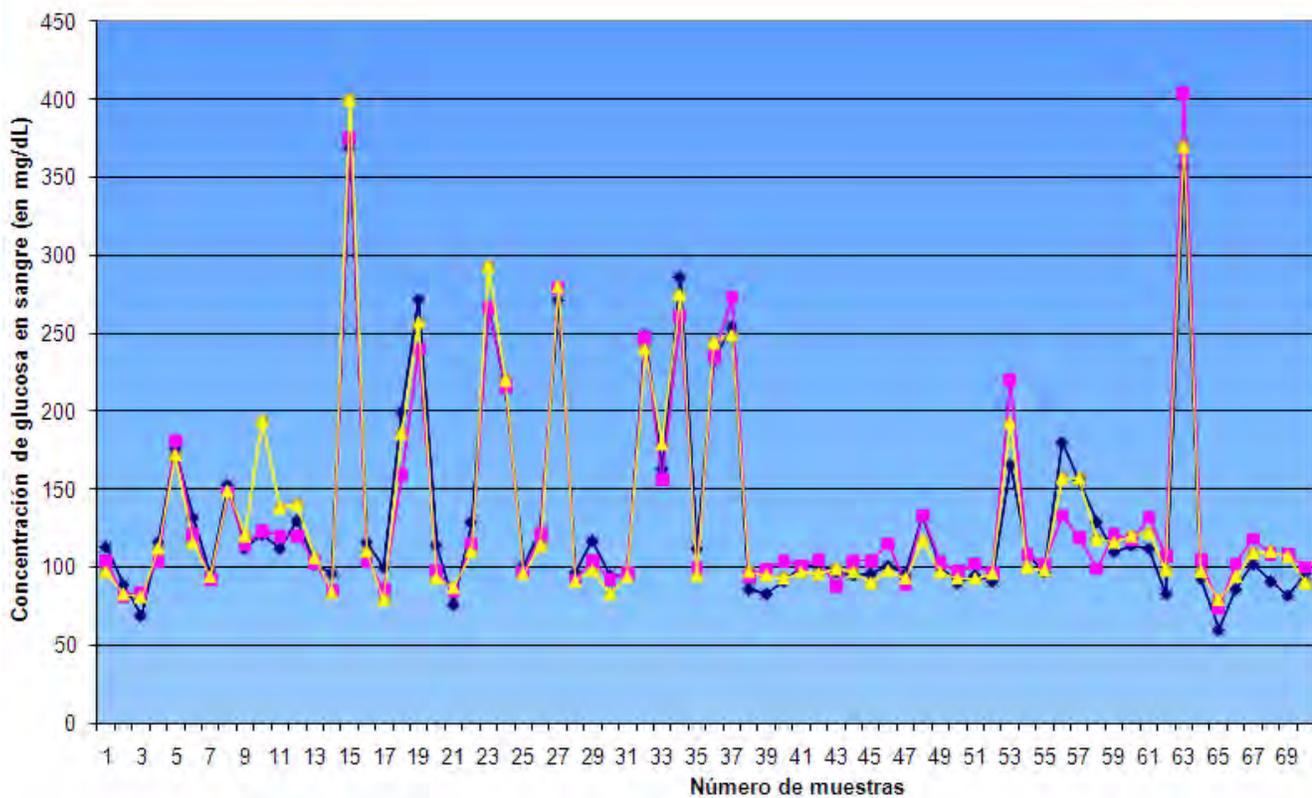


Figura 14. Representación gráfica de las comparaciones entre los valores de glucosa en sangre obtenidos con: ◆ glucómetro comercial OpXc, ■ glucómetro comercial AcCh y ▲ método enzimático de glucosa GOD-PAD por colorimetría de N,N-Dietilnilina-4-Aminoantipirina utilizado en el laboratorio.

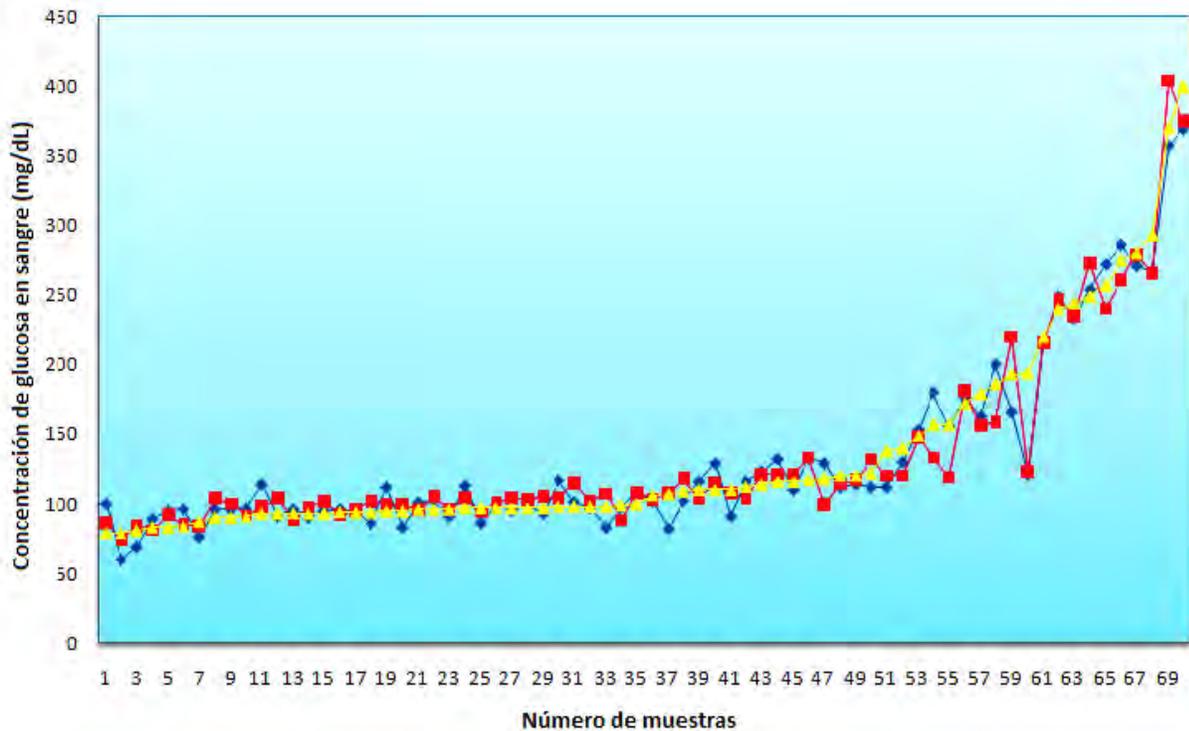


Figura 15. Representación gráfica de las comparaciones entre los valores de glucosa en sangre obtenidos con: ◆ glucómetro comercial OpXc, ■ glucómetro comercial AcCh y ▲ método enzimático de glucosa GOD-PAD por colorimetría de N,N-Dietilnilina-4-Aminoantipirina utilizado en el laboratorio, ordenados de manera ascendente con respecto a los valores del laboratorio.

En la representación gráfica de los valores individuales, obtenidos por los glucómetros comerciales y por el laboratorio, se observa que la mayoría de los datos se encuentran muy correlacionados, a pesar de la dispersión que se muestra en las gráficas, poseen una tendencia lineal, tanto la comparación de los valores obtenidos por los dos glucómetros comerciales (AcCh y OpXc), como la comparación de los valores obtenidos por el laboratorio de referencia con cada uno de los glucómetros comerciales, ver: figuras 16, 17 y 18.

El resultado obtenido por la prueba de Friedman indica que no existen diferencias significativas entre los valores de los dos glucómetros comerciales y los valores obtenidos por el método del laboratorio, por lo tanto se acepta la hipótesis nula (H_0).

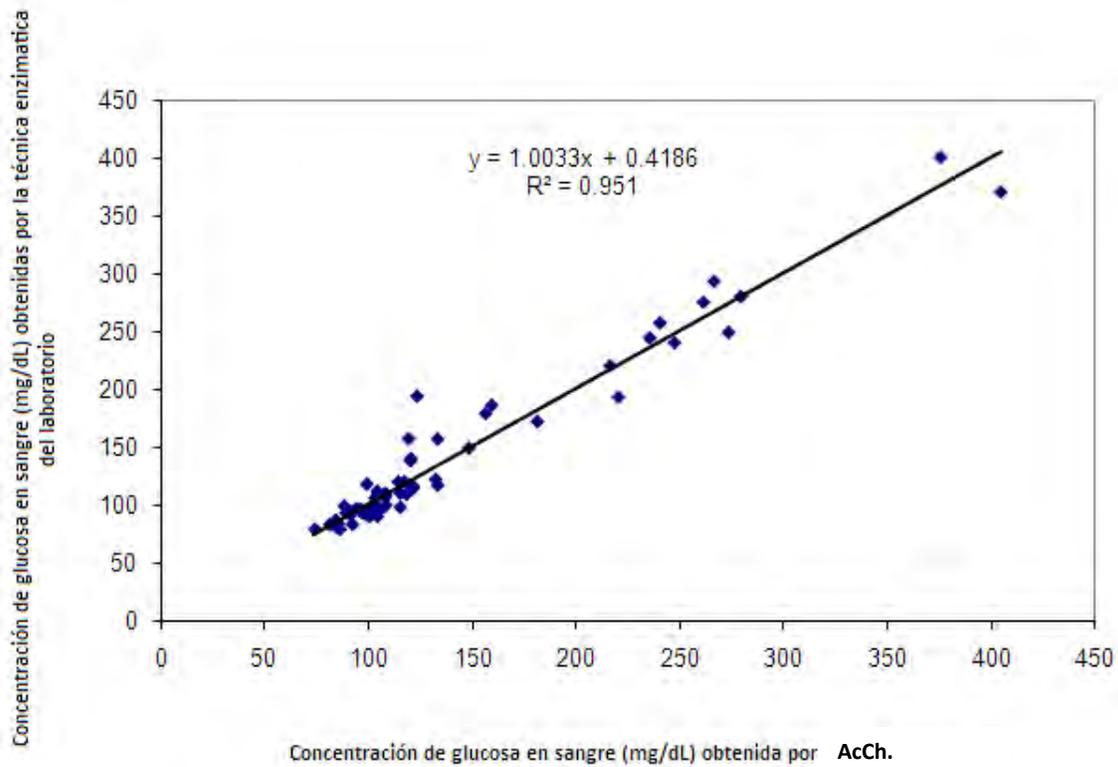


Figura 16. Representación gráfica de los valores obtenidos por el glucómetro AcCh VS la técnica enzimática del laboratorio de referencia.

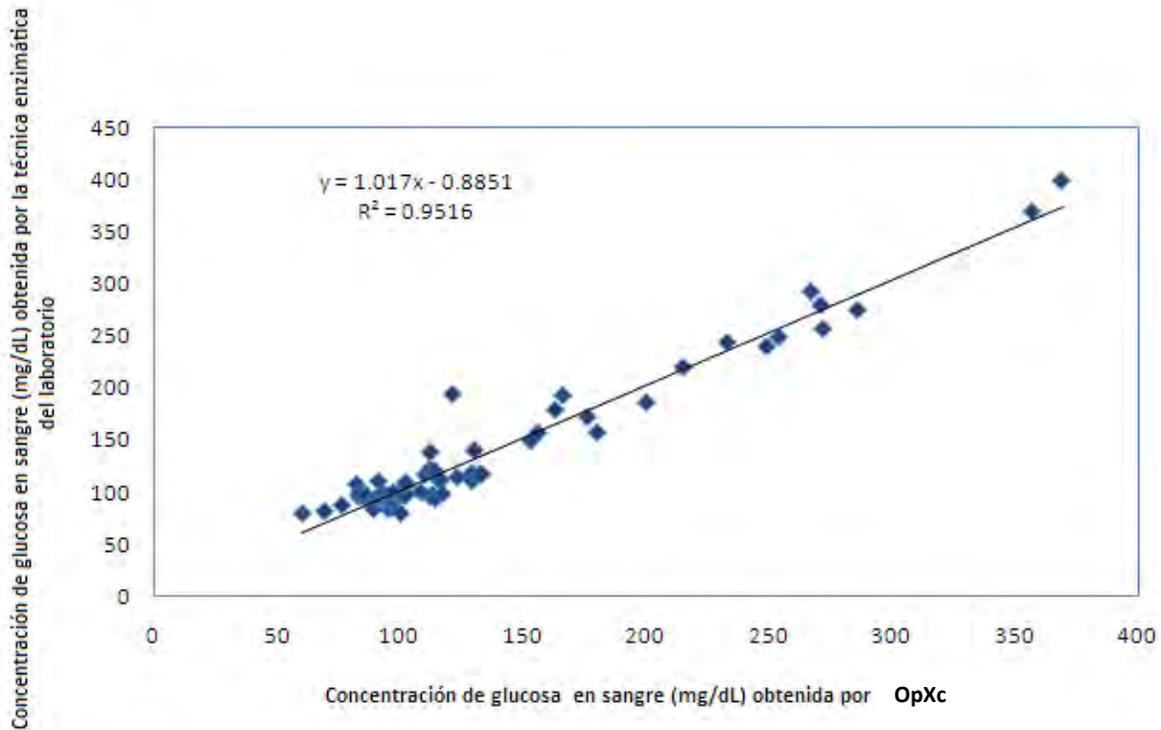


Figura 17. Representación gráfica de los valores obtenidos por el glucómetro OpXc VS la técnica enzimática del laboratorio de referencia.

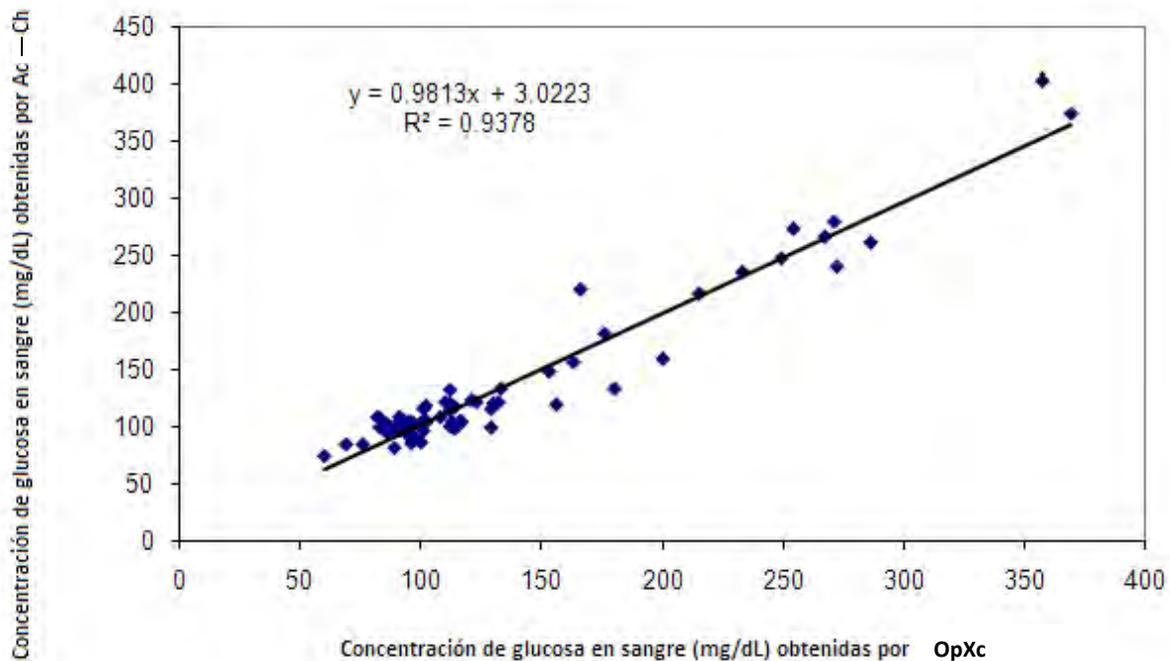


Figura 18. Representación gráfica de los valores obtenidos por el glucómetro OpXc VS el glucómetro AcCh.

11. DISCUSIÓN.

Los glucómetros comerciales, desde la década de los años 70's, han sido creados y utilizados en el apoyo del control de la glucemia en la diabetes mellitus. Los estudios que se han realizado acerca de las complicaciones de la diabetes, concuerdan que el monitoreo continuo, apoyado de dieta y ejercicio, contribuye a una mejora en la calidad de vida del paciente y evita que se desarrollen complicaciones agudas y crónicas propias de la enfermedad.

La ADA, en 1986, acepta el monitoreo personal para los pacientes que requerían el uso de insulina. Esto excluía al 90% de los pacientes diabéticos, pero con investigaciones recientes se ha implementado el uso de los glucómetros para monitorizar la glucemia en pacientes con diabetes tipo 2⁴. La diabetes, en estos últimos años, ha llegado a ser considerada un problema de salud pública por los costos de tratamiento y hospitalización, principalmente por las complicaciones crónicas que produce la enfermedad. El diagnóstico de la diabetes además de

basarse en criterios clínicos tiene como parámetro principal la medición de la glucemia. La medición de la glicemia se lleva a cabo en los laboratorios clínicos utilizando el método enzimático de glucosa oxidasa, el cuál es un método muy específico, éste método puede efectuarse dentro de los 30 minutos siguientes a la obtención de la muestra, pero el diagnóstico de diabetes por lo general es tardío y se llega a reconocer cuando ya existen complicaciones crónicas evidentes.

El uso del glucómetro se ha considerado sencillo y de amplia aplicación en la medición de la glucemia²⁷, por lo tanto en este estudio el objetivo principal es comparar los resultados obtenidos por dos glucómetros comerciales con los resultados que se obtienen del laboratorio clínico utilizando la técnica enzimática de determinación de glucosa en sangre, en una misma muestra, para analizar la validez de utilizar los glucómetros comerciales analizados en un laboratorio clínico.

Los datos obtenidos fueron analizados por la prueba de Friedman, la cual sirve para datos que no presentan una distribución normal. Esta prueba estadística permitió comparar los resultados obtenidos por OpXc y AcCh contra los resultados que se obtuvieron con la técnica enzimática de glucosa oxidasa utilizada en el laboratorio clínico. Se comparó los datos del glucómetro OpXc contra los datos del método utilizado en el laboratorio, obteniendo un resultado de $p = 0.904$ y se compararon los datos del glucómetro AcCh contra los datos que se obtuvieron por el laboratorio, obteniendo una $p = 0.272$, tabla 12.

Los resultados que se obtuvieron en la prueba de Friedman indican que los dos glucómetros, al compararlos contra el laboratorio, no existe diferencia significativa, el resultado que se obtiene en la comparación del glucómetro OpXc contra el laboratorio resultó tener un valor de p mayor que con la comparación de AcCh y el laboratorio, esto indica que entre los glucómetros analizados el más cercano a los datos del laboratorio es el OpXc.

También se analizó el coeficiente de correlación por la prueba de Spearman para poder observar el grado de relación que poseen los datos de los glucómetros con respecto a los datos del laboratorio y se obtuvieron una $P = 0.976$ y una $p = 0.975$,

tabla 13, para la comparación de los datos de OpXc contra los datos del laboratorio y los datos de AcCh contra los datos del laboratorio, respectivamente. Se observa que es una buena correlación, reforzando el resultado obtenido por la prueba de Friedman.

Al graficar los datos obtenidos por OpXc, AcCh y por el laboratorio (figura 14 y 15) se observa que los datos de los dos glucómetros son cercanos a los datos del laboratorio, esto indica que los datos de los glucómetros tienen una gran cercanía entre todos los datos reportados por el laboratorio.

Estadísticamente, los resultados indican que no existe diferencia significativa entre los datos obtenidos por los dos glucómetros y los datos obtenidos por el laboratorio, sin embargo, en la figura 15, se observa que los datos de los tres métodos (los dos glucómetros y el laboratorio), son semejantes, pero al detectar niveles de glucosa superiores a los 120 mg/dL algunos valores obtenidos por los glucómetros comienzan a alejarse de los datos del laboratorio. En la prueba estadística se utilizan las medias de los datos, esto provoca que los datos individuales en los que hay diferencias se mezclen con los datos en donde la variación es menor. Tomando en cuenta ésta observación se analizó individualmente cada uno de los datos obtenidos por los tres métodos, graficando los datos de cada uno de los glucómetros contra los datos obtenidos por el laboratorio.

Al graficar los datos de cada uno de los glucómetros contra los datos obtenidos por el laboratorio, ver: figuras 16 y 17, se observa que la distribución de los datos, en ambas gráficas, tiende a ser un modelo lineal. Esto indica que, al obtener un valor de glucosa elevado por el glucómetro, entonces el valor reportado por la técnica del laboratorio será semejante al reportado por el glucómetro. Al calcular la ecuación de la lineal para cada una de las gráficas, el coeficiente de determinación (R^2), de cada gráfica, indica que el modelo lineal propuesto explica la relación que hay entre las dos variables.

A pesar de obtener un buen coeficiente de determinación, se observa que la mayoría de los puntos de la población estadística, de las figuras 16 y 17, se encuentran en el intervalo de 75 a 130 mg/dL, una característica de estos puntos es que se asemejan a la línea de la ecuación de la recta propuesta. Al obtener resultados de concentración de glucosa mayores se observa que algunos puntos se alejan de la línea recta.

La diferencia que se observa entre los datos de ambos glucómetros con los del laboratorio se puede deber a que el nivel de glucosa de las muestras excede el rango de medición de los glucómetros.

En la figura 18 se compararon los datos de ambos glucómetros entre sí y la R^2 que se obtuvo fue menor que el R^2 de la comparación de cada uno de los glucómetros contra el laboratorio, esto se puede deber a la diferencia en que se procesa la muestra en cada uno de los glucómetros.

El glucómetro OpXc utiliza tiras reactivas que funcionan con electro-química, siendo éste un método avanzado, reduciendo las desventajas en cuanto a la dosificación de la muestra, manejo del glucómetro, análisis rápido. El glucómetro AcCh, utiliza en sus tiras reactivas una membrana en donde se encuentran fijados los reactivos, el glucómetro posee un lector óptico que mide la intensidad de color formado de la reacción y así cuantifica la cantidad de glucosa de la muestra.

Muchas de las instituciones de salud en México han comenzado a utilizar los glucómetros como prueba rápida para la determinación de glucosa y como apoyo en el monitoreo de la glucemia de los pacientes diagnosticados con diabetes mellitus. En los laboratorios clínicos, la glucemia se ha estado analizado por medio de métodos enzimáticos, siendo éstos métodos los más específicos para el análisis de glucosa. Con la creciente incidencia de la diabetes mellitus en México, se está requiriendo que en los laboratorios de diagnóstico clínico se trabaje con métodos confiables rápidos, económicos y sencillos para el análisis y detección del inicio de la enfermedad.

12. CONCLUSIONES.

En el control de la glucemia en pacientes diabéticos y no diabéticos es de gran importancia ya que existe una relación directa entre los niveles de glucosa en sangre y sus complicaciones. Las técnicas para determinar la glucosa por el método enzimático GOD-PAD, utilizada por los laboratorios clínicos son de gran ayuda en el control de la glucemia al ser específicos, pero no toda la población tiene acceso a éste análisis principalmente por costos. En la actualidad se han desarrollado dispositivos para la medición de glucosa que ofrecen ventajas en el tiempo del tratamiento de la muestra, así como en la reducción en el material utilizado, en el uso de reactivos y producción de residuos peligrosos.

Con los glucómetros comerciales analizados se obtienen resultados que no son estadísticamente diferentes a los resultados obtenidos a través de la técnica del laboratorio. Los glucómetros comerciales mostraron ser muy sencillos en su manejo para la determinación de glucosa, en cambio con la técnica utilizada en el laboratorio fue un método laborioso, por lo cual se puede utilizar como prueba rápida en el laboratorio clínico.

El costo por la determinación de glucosa utilizando los glucómetros, resulto ser más económico en comparación con el costo de una determinación de glucosa con la técnica del laboratorio, esto puede permitir que una mayor cantidad de la población pueda acceder al análisis de glucosa en sangre, obteniendo resultados en menor tiempo.

Sin embargo algunos resultados de las muestras se observa que difieren del modelo lineal propuesto, esto se puede deber a que el nivel de glucosa de la muestra exceda el rango de medición del glucómetro, por lo que deberán ser empleados, siendo cuidadosos en el manejo de los glucómetros.

En el laboratorio clínico los resultados que se obtienen son de gran importancia ya que repercuten en el paciente, los métodos así como los resultados deben ser confiables y evitar cualquier efecto del ambiente para producir un resultado falso.

13. ANEXO.

13.1 PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRA SANGUÍNEA, SANGRE VENOSA.

I. CONDICIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA.

Es necesario que la persona que va a tomar la muestra adopte actitud de confianza, seguridad y equilibrio.

Conocer y realizar los procedimientos necesarios para minimizar los errores en la toma de muestras.

Explicar brevemente al paciente las maniobras que va a realizar para obtener la mayor colaboración posible. Debe tranquilizarse al paciente para disminuir el estado de estrés.

Revisar que todo el material esté listo (tubos rotulados, torundas de algodón, alcohol, ligaduras, jeringa, gradilla, tapones).

El paciente y el operador deben estar en posición confortable y en un sitio con buena iluminación.

El paciente debe estar sentado cómodamente y debe extender el brazo sobre el borde de una mesa, encima de una toalla desechable, para tener acceso fácil y cómodo a la fosa antecubital. Evitar el uso de bancos altos sin respaldo.

Es necesario tener en cuenta el tipo de análisis, el volumen de la muestra y la edad del paciente.

Para un volumen mayor, el sitio más adecuado es la vena que se encuentra en el pliegue anterior de la flexión del codo, se recomienda utilizar la vena mediana basílica o cefálica.

En los pacientes obesos las venas que se observan azulosas son demasiado superficiales y pequeñas y es mejor no utilizarlas.

II. PROCEDIMIENTO PARA LA PUNCIÓN VENOSA.

1. Verificar que las etiquetas coincidan con la solicitud de las pruebas.
2. Se identifica al paciente comprobando su nombre completo y fecha de nacimiento. Si se encuentra inconsciente, debe de verificarse su identidad a través de una enfermera o un familiar.
3. No se debe extraer muestra alguna sin identificar adecuadamente al paciente.
4. Si se solicita una muestra en ayunas, debe comprobarse que el paciente no ha ingerido alimentos. Hay que dirigirse al paciente e informarle sobre el procedimiento.
5. Se debe colocar adecuadamente al paciente, según se encuentre sentado o en decúbito prono, para tener acceso fácil a la fosa antecubital.
6. Se debe preparar todo el material, incluidos los tubos, la ligadura, los objetos para limpiar la piel, las jeringas; cuando sea necesario, la aguja estéril y el dispositivo para fijarla.
7. Se solicita al paciente que cierre el puño para que las venas resulten más palpables.
8. Se selecciona la vena adecuada para la punción.
9. Se limpia la zona de la punción con una torunda humedecida con alcohol isopropílico al 70%. Se comienza en el punto de la punción y se prosigue la limpieza hacia fuera siguiendo un movimiento espiral.
10. Se aplica un torniquete varios centímetros por encima de la zona de punción. No dejarlo más de un minuto.
11. Se fija la vena tanto por encima como por debajo del lugar de punción, con ayuda de los dedos pulgar y medio o índice y pulgar.
12. Se realiza la venopunción: a) se penetra la piel con la aguja formando un ángulo de 15° con el brazo y con el bisel hacia arriba se sigue la dirección

de la vena; b) se introduce la aguja con suavidad pero con rapidez para reducir las molestias. No hay que “enterrar” la aguja; c) si se utiliza una jeringa, se tira hacia atrás del émbolo, con tensión lenta y uniforme a medida que la sangre va fluyendo en su interior; d) si se utiliza un tubo al vacío, en cuanto la aguja haya penetrado en la vena se dirigirá el tubo todo lo posible hacia delante apoyándose en el dispositivo de sujeción (de la misma forma en que se introduce el émbolo de una jeringa). Al mismo tiempo mantenga firmemente la aguja en su lugar. Una vez que se haya llenado el tubo, se retira cogiéndolo por su extremo y tirando suavemente de él.

13. Si la muestra ha sido extraída con jeringa se transferirá la sangre a los tubos correspondientes después de retirar la aguja.

14. Colocar las muestras en una gradilla e identificarlas.

13.2 PROTOCOLO DEL GLUCOMETRO COMERCIAL OpXc.

El protocolo consistió de los siguientes pasos.

I. PREPARACION DEL EQUIPO.

Lavarse las manos con agua, jabón y asepticar el área de toma de muestra.

Preparar en la mesa de trabajo el siguiente material:

-Guantes, algodón, alcohol isopropílico al 70%, soporte para la aguja (vacutiner), agujas desechables estériles calibre 20, 19 o 18 (vacutiner), tubos de tapón rojo sellados al vacío, ligadura de goma (2-5 mm de diámetro por 35-40 cm. de largo), Glucómetro OpXc, Calibrador del glucómetro, tiras de prueba de glucosa en sangre (Medisense, Op), margen del ensayo: 20-500 mg/dL, contenedor de punzocortantes, contenedor rojo de residuos peligrosos.

II. CALIBRACIÓN DEL EQUIPO.

1. Sostener el calibrador con el número de lote apuntando hacia el operador.
2. Introducir el calibrador en puerto de la tira, ubicada en la parte inferior del monitor, la barra de contacto del calibrador.
3. Empujar el calibrador hasta el tope del monitor.
4. Esperar hasta que se encienda automáticamente y observar que aparezca el número de lote del calibrador en la parte superior de la pantalla del monitor.

III. PREPARACION Y EJECUCION DE LA MEDICION DE GLUCOSA.

1. Tomar una tira de prueba de su caja y retirar su envoltura de aluminio.
2. Introducir en el puerto de la tira los electrodos (tres líneas negras), que se encuentran en un extremo de la tira de prueba.
3. Empujar la tira de prueba hasta el tope del glucómetro y observar que el monitor se encienda automáticamente.
4. Verificar la pantalla. Observar la aparición de los componentes de la pantalla del monitor (pantalla completa).
5. Verificar que el número de lote, que aparece en la parte superior de la pantalla del monitor, sea igual al de la tira reactiva que se esté usando.
6. Esperar que aparezca en forma intermitente el símbolo de una gota en la pantalla, esto indica que medidor está listo para que se aplique la muestra de sangre total a la tira de prueba de glucosa en sangre.
7. Colocar la gota de sangre de la muestra problema, obtenida por punción venosa (ver protocolo de punción venosa), en la zona blanca en la punta de la tira de prueba y esperar a que la sangre se absorba hasta cubrir la zona blanca.

8. Esperar a que el medidor comience la prueba cuando se escuche una señal acústica, duración de la prueba de 5 segundos, aparece una barra de estado en la ventana de la pantalla y, por último, aparece la cuenta regresiva en la ventana de la pantalla.
9. Al finalizar la cuenta regresiva, observar la aparición del resultado en la pantalla del medidor.
10. Retirar la tira de prueba del medidor.
11. Desechar la tira en la bolsa roja.

13.3 PROTOCOLO DEL GLUCOMETRO COMERCIAL AcCh

I. PREPARACION DEL EQUIPO

Lavarse las manos con agua, jabón y asepticar el área de toma de muestra.

Preparar en la mesa de trabajo el siguiente material:

-Guantes, algodón, alcohol isopropílico al 70%, soporte para la aguja (vacutiner), agujas desechables estériles calibre 20, 19 o 18 (vacutiner), tubos de tapón rojo sellados al vacío, ligadura de goma (2-5 mm de diámetro por 35-40 cm. de largo), Glucómetro AcCh, Chip de calibración del glucómetro, tiras de prueba de glucosa en sangre (AcCh), Margen del ensayo: 10-600 mg/dL, contenedor de punzocortantes, contenedor rojo de residuos peligrosos.

II. CODIFICACION DEL EQUIPO

1. Para codificar el equipo se necesita extraer el chip (naranja) de codificación del envase de las tiras reactivas.
2. Introducir el chip de codificación de forma recta y sin realizar fuerza en la abertura para el chip de codificación, ubicada en el lado izquierdo del equipo. El equipo debe estar previamente desconectado.

Verificar que el chip se encuentre bien conectado.

III. PREPARACION Y EJECUCION DE LA MEDICION DE GLUCOSA

1. Extraer una tira reactiva del estuche, volver a cerrar éste inmediatamente.
2. Comparar la ventanilla de control redonda en la parte posterior de la tira reactiva con la escala cromática en el envase de la tira reactiva.
3. El color de la ventanilla de control tiene que coincidir con el color del punto superior (0 mg/dl).
4. Evitar utilizar tiras que se detecten con una coloración divergente al color del punto superior (0 mg/dl) de la escala cromática del envase.
5. Después introducir la tira al medidor, observando que las flechas impresas se encuentren hacia arriba.
6. Introducir la tira reactiva en forma recta. El aparato se va a conectar automáticamente y observar con atención las cifras numéricas que van a aparecer en la pantalla del medidor.
7. Las cifras que van a aparecer en el monitor del medidor deben coincidir con el número de código impreso en la caja de las tiras reactivas.
8. Esperar hasta que aparezca en forma intermitente el símbolo de una gota en la pantalla.
9. Aplicar una pequeña gota de sangre de la muestra problema, obtenida por punción venosa (ver protocolo de punción venosa), en medio de la zona de aplicación rectangular, color anaranjado.
10. El medidor, con una señal sonora, indicará que la aplicación de sangre fue detectada, evitar el contacto con la tira reactiva.
11. Al cabo de 5 segundos se termina la medición con una segunda señal sonora.

12.Extraer la tira reactiva del medidor, el medidor se desconecta automáticamente. Desechar la tira reactiva en la bolsa roja.

13.4 PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE, MÉTODO ENZIMÁTICO POR COLORIMETRIA DE N,N-Dietilanilina-4-Aminoantipirina.

El protocolo consistió en los siguientes pasos:

I. PREPARACIÓN DEL EQUIPO

Lavarse las manos con agua, jabón y aseptizar el área de toma de muestra.

Preparar en la mesa de trabajo los siguientes materiales y reactivos:

Material.

Guantes, algodón, alcohol isopropílico al 70%, soporte para la aguja (vacutiner), agujas desechables estériles calibre 20, 19 o 18 (vacutiner), tubos de tapón rojo sellados al vacío, ligadura de goma (2-5 mm de diámetro por 35-40 cm. de largo), espectrofotómetro (Photrometer, Modelo M, Marca E. Leitz U.S.A.), celdas de vidrio o plástico de 1 cm, tubos de ensayo de 13x100 cm, gradilla, vaso de precipitados de 250 mL, micropipeta de 1000 μ L, micropipeta de 10 a 1 μ L, Centrifuga (Marca SOL-BAT, Modelo J-12, V-115, México), balanza analítica (Adventurer OHAUS, ARA520, Max. 1500g, Readability 0.1g) contenedor de punzocortantes, contenedor rojo de residuos peligrosos.

I. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de sangre, previamente identificadas, se dejan reposar para formar el coágulo. Retirar el coágulo con ayuda de un palillo de madera. Depositar en coágulo en un contenedor rígido rojo.

Nivelar cada muestra antes de colocarla en la centrífuga. Centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos para separar el suero del paquete celular de la sangre.

Retirar las muestras de la centrifuga y colocarlas en una gradilla.

II. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.

1. Colocar en una gradilla 5 tubos de ensayo de 13x100 limpios y secos. Etiquetar cada tubo de ensayo con: 300mg/dl, 100mg/dL, 75 mg/dL, 45 mg/dL y el Blanco.
2. Transferir 1 mL del reactivo de trabajo a cada uno de los tubos.
3. Agregar 4 μ L de cada solución patrón y colocarla en su tubo de ensayo correspondiente, el tubo de ensayo que corresponde al blanco no se le transfiere ninguna solución.
4. Mezclar suavemente y dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente por 10 minutos.
5. La coloración es estable por 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Colocar en la gradilla un tubo de ensayo de 13X100 limpio y seco.
7. Transferir 1 mL del reactivo de trabajo y etiquetar el tubo de ensayo de la muestra.
8. Agregar 4 μ L del suero de la muestra a analizar.
9. Mezclar suavemente y se dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente por 10 minutos.
10. Encender el colorímetro para precalentar (10 minutos).
11. Seleccionar con el monocromador la longitud de onda a 553 nm.
12. Colocar una cubeta con agua destilada y ajustar, con las palancas de ajuste, la escala a cero de absorbancia.

13. Leer la solución blanco y ajustar a 0 de absorbancia.
14. Leer las soluciones patrón a 553 nm y anotar las absorbancias.
15. Leer la o las muestras problema a 553 nm y anotar las absorbancias.
16. Graficar las absorbancias obtenidas contra la concentración relativa (300 mg/dL, 100 mg/dL, 75 mg/dL y 45 mg/dL).

El orden en que se agregaron los diferentes reactivos se muestra en la siguiente tabla.

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar	--	4 μ L	--
Muestra	--	--	4 μ L
Reactivo de trabajo	1mL	1mL	1mL

Tabla: Procedimiento para la determinación de glucosa por el método GOD-PAD de N,N-dietilnilina-4-Aminoantipirina. Donde Blanco es el reactivo de trabajo, se trabaja a una longitud de onda de 553 nm, con celdas de plástico de 1 cm (paso de la luz). Se deja reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.

III. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN LAS MUESTRAS.

La cantidad de glucosa en las muestras se calcula por la interpolación en la curva estándar de glucosa, obtenida por los valores de absorbancia de los diferentes estándares, para realizar los cálculos tomar en cuenta las diluciones de la muestra si se han realizado diluciones.

También se puede calcular la cantidad de glucosa en la muestra utilizando la ecuación de la línea recta que se obtiene de la curva estándar, sustituyendo y despejando en la ecuación.

IV. CALCULOS.

Para obtener calcular la cantidad de glucosa se requiere conocer la ecuación de la línea recta:

$$Y = mX + b$$

Ésta ecuación se obtiene de la gráfica de la curva estándar, donde Y representa la absorbancia, X representa la concentración de glucosa (mg/dL), la m representa la pendiente de la recta y b representa la ordenada al origen. A la ecuación de la recta se le realiza un despeje de la variable X quedando la ecuación de esta manera:

$$X = \frac{Y - b}{m}$$

Una vez despejada la variable se sustituyen los valores obtenidos de absorbancia de la muestra y los valores de m y de b.

Ejemplo:

Valor de m = 0.0009 dL/mg

Valor de b = 0.5356

Valor de $R^2 = 0.94$

Valor de la muestra en Abs. = 0.76

$$\text{glucosa (mg/dL)} = \frac{(0.76) - (0.5356)}{(0.0009 \text{ dL / mg})} = 249 \text{ mg/dL}$$

Concentración de glucosa (mg/dL) = 249 mg/dL en suero de la muestra.

V. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

1. El método es lineal hasta valores de 500 mg/dL.
2. Si la concentración de glucosa es superior, diluir la muestra a 1:2 con solución salina 0.9% y multiplicar el resultado por 2.
3. Una curva de calibración activa es necesaria para todos los ensayos. Para el ensayo de glucosa, es preciso calibrar cada día al iniciar los análisis de glucosa con el fin de mantener una curva activa.

13.5 CRITERIOS DE LABORATORIO PARA ESPECÍMENES INACEPTABLES.

Las causas más frecuentes de rechazo de especímenes sanguíneos son:

1. **Identificación inadecuada.** Cada laboratorio debe determinar la cantidad mínima de información del paciente que debe ser incluida en la solicitud de laboratorio y en el recipiente de la muestra. Esta información incluye generalmente nombre, dirección, habitación, número de identificación, sexo, edad. El flebotomista debe verificar visual y verbalmente la identidad del paciente, comparando su nombre con el de la pulsera de identificación, la prueba requerida y las etiquetas. El tubo y la solicitud de laboratorio deben volverse a controlar para verificar su identidad luego de ser recibidos. Las diferencias entre el nombre de la solicitud del laboratorio y el envase de la muestra es causa de rechazo de ésta.
2. **Volumen de sangre inadecuado recogido en tubos o jeringas con aditivo.** La cantidad de aditivo adicionada a un tubo al vacío presupone que éste se llenará totalmente con sangre. Si se extrae menos sangre de la requerida, la cantidad excesiva de aditivo tiene el potencial de afectar adversamente la exactitud de los resultados de las pruebas.
3. **Utilización de tubos de recolección inadecuados.** En general, el suero es la muestra preferida para la mayoría de los análisis bioquímicos. Los tubos

de fluoruro de sodio diseñados para la muestra de glucosa son inapropiados para la mayor parte de los otros procedimientos.

4. **Hemólisis.** La hemólisis puede ser el resultado de una venipuntura difícil o de un manejo impropio del espécimen recolectado. La hemólisis también puede resultar de un proceso de la enfermedad que causa la destrucción intravascular de los eritrocitos. La hemólisis visible es inaceptable (mayor a 200 mg/L de hemoglobina) cuando se analizan estas sustancias utilizando ciertos métodos. El grado de interferencia depende del grado de hemólisis, la concentración de la variable analítica y la metodología empleada.
5. **Transporte inapropiado.** En las muestras existe una significativa susceptibilidad de éstas al deterioro, no deben ser analizadas si no son transportadas al laboratorio en hielo y dentro de un tiempo preestablecido, para la glucosa un mínimo de 2 hrs.
6. **Tiempo preanalítico permisible.** Cuando el tiempo máximo permisible es excedido, deben tomarse medidas. La falsificación de los resultados será asumida médicamente. El responsable del laboratorio marcará el resultado obtenido con una nota apropiada, o se negará a llevar a cabo la prueba. La última medida es especialmente aconsejable cuando la conclusión médica puede deducirse del resultado, lo cual es una desventaja para el paciente.

13.6 PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

Soluciones estándar de glucosa de 300 mg/dl, 100 mg/dl, 75 mg/dl y 45 mg/dl.

Solución de trabajo combinada (combined reagent), para la determinación de glucosa, con la siguiente fórmula (para preparar 100 mL):

FORMULA.	
Glucosa Oxidasa	3200 U
Peroxidasa de rabano	3000 U
4-aminoantipirina	62 mg
N,N-dietilanilina	50 μ L
Azida de sodio	100 mg
Buffer de fosfatos (5 mmol/L, pH 7)	100 ml

I. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO.

Preparación del Amortiguador de fosfatos.

Se coloca, en un matraz volumétrico de 1000 mL, 3.38 g de fosfato dibásico (K_2HPO_4) y 4.16 g de fosfato monobásico (KH_2PO_4). Se procede a disolver los cristales con agua destilada con agitación constante del matraz volumétrico y, posteriormente, se afora a 1000 mL con agua destilada.

Una vez aforado se vierte la solución en un vaso de precipitados de 1000 mL y se procede a medir el pH de la solución con un electrodo. Se lleva la solución a pH 7 utilizando NaOH 1M con agitación constante.

Se vierte la solución en un recipiente de vidrio o plástico y se etiqueta.

Preparación del Reactivo de Trabajo.

Para la preparación del reactivo de trabajo se calcularon las cantidades de cada reactivo de la solución para preparar 250 mL.

Preparar un matraz aforado de 250 mL y cubrirlo con papel aluminio hasta la línea de aforo.

Pesar en la balanza analítica 61.58 mg (8000 U) de glucosa oxidasa (D-glucosa: O_2 -oxidoreductasa, G7141, No. CAS 9001-37-0, Sigma-Aldrich S.A. de C.V.),

pesar, en la misma balanza, 18.82 mg (7500 U) de peroxidasa de rabano (Donador: H₂O₂ oxidoreductasa, tipo VI, EC 1.11.1.7, CAS RN 9003-99-0, P8375, Sigma-Aldrich S.A. de C.V.) y verter en el matraz volumétrico con cuidado.

Después pesar 155 mg de 4-aminoantipirina (Sigma-Aldrich S.A. de C.V.), verter éste reactivo al matraz volumétrico de 250 mL. Se toma una micropipeta de 200 µL y se ajusta para tomar un volumen de 125 µL de N,N-dietilanilina (Sigma-Aldrich S.A. de C.V.), se vierte con cuidado en el matraz volumétrico de 250 mL. Se pesa 250 mg de azida de sodio (Sigma-Aldrich S.A. de C.V.) y se vierte en el matraz volumétrico.

Una vez que se tienen los reactivos que componen el reactivo de trabajo se vierte un volumen de amortiguador de fosfatos, en el matraz volumétrico, con el propósito de diluir los cristales de los reactivos presentes en el matraz. Una vez mezclados y diluidos se vierte buffer de fosfatos hasta la marca de aforo del matraz volumétrico. Dejar reposar el reactivo de trabajo por 24 horas.

El reactivo de trabajo se utiliza fresco cada día y se mantiene en refrigeración después de su uso.

II. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES PATRÓN.

Para preparar las soluciones patrón de glucosa se necesita preparar una solución de ácido benzoico al 0.2%, ésta solución será el disolvente para las soluciones patrón de glucosa.

Para preparar 1 L de ácido benzoico al 0.2% se pesa en la balanza analítica 2 g de ácido benzoico (Sigma-Aldrich S.A. de C.V.) y se colocan en un matraz volumétrico de 1000 mL, después se vierte agua destilada caliente para favorecer la solubilidad del ácido benzoico frente al agua. Se agita para disolver los cristales.

Una vez que los cristales de ácido benzoico se han disuelto se afora con agua destilada hasta la marca de aforo. Se vierte en un recipiente y se etiqueta.

Para las soluciones patrón se proponen las siguientes concentraciones de glucosa.

300, 100, 75 y 45 mg/dL.

Disolver 0.3 g de glucosa (D-(+)-Glucosa, G-8270, EC 200-075-1, Sigma-Aldrich S.A de C.V.), en 100 mL de una solución de ácido benzoico al 0.2%. Ésta solución contiene 300 mg/dL de glucosa. Esta solución se utiliza para preparar las siguientes concentraciones propuestas. Diluir 8.33 mL de la solución que contiene 300 mg/dL con 16.67 mL de solución de ácido benzoico al 0.2% para tener una solución de 100 mg/dL.

Diluir 6.25 mL de la solución que contiene 300 mg/dL con 18.75 mL de solución de ácido benzoico al 0.2% para tener una solución de 75 mg/dL.

Diluir 3.75 mL de la solución que contiene 300 mg/dL con 21.25 mL de solución de ácido benzoico al 0.2% para tener una solución de 45 mg/dL.

14. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aguilar, M. Criterios diagnósticos de la diabetes mellitus: un debate permanente. Av Diabetol 2001; 17: 133-140
2. Alfaro, P. et al. Inactivación Térmica de la Glucosa Oxidasa de *Aspergillus niger*. Sociedad Mexicana de Bioquímica 2005; 1: 1-7
3. Alves Grossi, S. A. et al. Home blood Glucose monitoring in type 1 Diabetes Mellitus. Rev Latino-am Enfermagem 2009; 17(2):194-200
4. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2010; 33 (1): S62-S69
5. Barja, S. et al. Intolerancia a la glucosa en niños obesos: comunicación preliminar. Rev. Med. Chile 2003; 131: 419-426
6. Bastarrachea, R. A. et al. Análisis crítico de los nuevos criterios que sustentan el diagnóstico de pre-diabetes. Revista de Endocrinología y Nutrición 2004; 12 (2): 90-96
7. Bermúdez, V. et al. Utilidad y ventajas del uso de Modelos Matemáticos en el estudio de la Insulinorresistencia y función de la Célula Beta Pancreática. Homeostasis. Archivos venezolanos de farmacología y terapéutica 2001; 20 (1): 43-51
8. Bermúdez, V. et al. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. Archivos venezolanos de farmacología y terapéutica 2007; 26 (02):76-86
9. Bishop, L. M. Química Clínica: Principios, Procedimientos y Correlaciones. 5ª edición. Editorial Mc Graw Hill. México 2006. Pp. 262-281
10. Blanco, P. Enfermería y Diabetes. Editorial Verbo Divino. Bolivia 2007. Pp. 18-78

11. Bosquet, G. L. Características, diagnóstico y tratamiento de la diabetes. OFFARM 2001: 72-77
12. Bracho, F. Cetoacidosis Diabética. Medicrit 2005; 2 (1): 9-15
13. Brubaker, L. P., Younes, A. Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. Can. J. Physiol. Pharmacol 2003; 81: 1005-1011
14. Collins, M. M. et al. La calidad de vida y de atención de los pacientes con diabetes que experimentan diferentes modelos de atención clínica. Diabetes Care 2009; 10 (5): 158-160
15. Daniel, W. W. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 5ª edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México 1999. Pp. 22-63, 252-301, 723-729, 737-740
16. David, M. N. et al. Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy. Diabetes Care 2009; 32 (1): 193-203
17. Debussche, X. et al. Dificultad para el autocontrol diabético en países en vías de desarrollo. Diabetes Voice 2009; 54: 12-14
18. Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades no Transmisibles. Diabetes mellitus tipo 2. Boletín informativo, México 2007
19. Drucker, J. D. The role of gut hormones in glucose homeostasis. The journal of Clinical Investigation 2007; 117 (1): 24-32
20. Epidemiología. El SUIVE y la Prevalencia de Diabetes Mellitus Tipo II. Vigilancia Epidemiológica 2009; 30 (26): 1-3
21. Epidemiología. El SUIVE y la Prevalencia de Diabetes Mellitus Tipo II. Vigilancia Epidemiológica 2009; 31 (26): 1-3

22. Faerch, K. et al. Evolución natural de la sensibilidad a la insulina y de la secreción de insulina en la progresión de la tolerancia normal a la glucosa a la alteración de la glucemia en ayunas y la intolerancia a la glucosa: estudio Inter99. Diabetes Care 2009; 10 (4): 113-118
23. Farmer, A. Automonitorización de la glucemia en personas con diabetes tipo 2: la necesidad de entender mejor. Diabetes Voice 2009; 54: 15-18
24. Ferranini, L. Hiperglicemia Postprandial, Factor Emergente de Riesgo Cardiovascular en la Diabetes Tipo 2. Medwave 2002; 2 (5): 1-22
25. García, G. Ma. M. et al. Estudio comparativo de tres métodos para efectuar diagnósticos rápidos de hipoglucemia neonatal. Medicina Universitaria 1999; 2 (5): 5-8
26. Golberg, R. B. et al. Efecto de la progression de intolerancia a la glucose a diabetes en los factores de riesgo cardiovascular y su mejora mediante la intervención con metformina y cambios en los hábitos de vida. Diabetes Care 2009; 10 (5): 145-151
27. Gómez Quevedo, L. et al. Validez de cuatro glucómetros portátiles para su uso en atención primaria. Medicina Familiar 2001; 2 (2): 132-138
28. Haces, B. M. et al. Mecanismos de Muerte Neuronal Asociados a la Hipoglucemia. Arch. Neurocién. 2005; 10 (2): 1-18
29. Hamden, K. et al. 1 α ,25 Dihydroxyvitamin D3: Therapeutic and Preventive Effects against Oxidative Stress, Hepatic, Pancreatic and Renal Injury in Allomaxam-Induced Diabetes in Rats. J. Nutr. Sci Vitaminol 2009; 55: 215-222
30. Harrison, T. R. Principios de Medicina Interna. 17^a edición. Vol. II. Editorial Mc Graw Hill. México 2008. Pp. 2275-2310

31. Henry, B. J. El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. Editorial Marbán Libros, S.L. España 2005. Pp. 211-223
32. Hernández, A. R. Glucómetro no invasivo. Revista de la Facultad de Medicina 2005; 10 (2): 22-27
33. Hernández, F. C. Determinación de los niveles de glucosa antes del tratamiento dental, comparando dos métodos no invasivos y un invasivo en pacientes de las clínicas de posgrado de la UDLSB. Revista Electrónica Nova Scientia 2008; 1 (1): 65-79
34. Hlebowicz, J. et al. Effect of commercial rye whole-meal bread on postprandial blood glucose and gastric emptying in healthy subjects. Nutrition Journal 2009; 8 (26): 1-5
35. Hui, H. et al. Hypoglycemic herbs and their action mechanisms. Chinese Medicine 2009; 4 (11): 1-11
36. Humberto José Olivero Lara. Variación entre los valores de glucemia obtenidos con los glucómetros digitales, en base a la técnica de antisepsia realizada en piel, previo a la toma de la muestra. Universidad Francisco Marroquín, Facultad de Medicina, Guatemala 2004
37. Ishigaki, S. et al. Insulinoma with Six Islet Cell Tumors Associated with Severe Hypoglycemia. Inter Med 2009; 48: 1041-1046
38. Kabasakalian, P. et al. Enzymatic blood glucose determination by colorimetry of N,N-Diethylaniline-4-aminoantipyrine. Clinical Chemistry 1974; 20 (5): 606-607
39. Kannappan, S., Anuradha, C. V. Insulin sensitizing actions of fenugreek seed polyphenols, quercetin & metformin in rat model. Indian J. Med. Res. 2009: 401-408

40. Lehninger, David, L. N., Michael, M. C. Principles of Biochemistry. 4a edición. Editorial Omega. España 2005. Pp. 239-271, 521-555, 561-597
41. Leon, I. Guías para el diagnóstico y tratamiento del síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Nuevos criterios. Salus Guías 2007; 8 (1): 3-7
42. Li, Y. et al. β -Cell Pdx1 Expression is Essential for the Glucoregulatory, Proliferative, and Cytoprotective Actions of Glucagon-Like Peptide-1. Diabetes 2005; 54: 482-491
43. Lin, C. H. et al. Using the 100-g Oral Glucose Tolerance Test to Predict Fetal and Maternal Outcomes in Women with Gestational Diabetes Mellitus. Chang Gung Med J. 2009; 32 (3): 283-288
44. Lynch, M. J. Métodos de laboratorio. 2ª edición. Editorial Interamericana. México 1972. Pp. 426-444, 553-563
45. Macarulla, M. J. Bioquímica cuantitativa, cuestiones sobre metabolismo. Editorial Reverté. México 1992. Pp. 424-505
46. Mailing, A. Diabetes Mellitus Tipo 2. Editorial Consejería de Salud. Sevilla 2002. Pp. 34-95
47. Matsuo, M. ATP-Binding Cassette Proteins Involved in Glucose and Lipid Homeostasis. Biosci. Biotechnol. Biochem 2010; 74 (5): 1-9
48. Mc. Murry, J. Química Orgánica. 6ª edición. Editorial Thomson. México 2004. Pp. 942-977
49. Mendoza Romo, M. A. et al. Correlación del monitoreo glucémico entre el método visual y computarizado pre y post capacitación. Rev Enferm IMSS 2003; 11 (1): 19-24

50. Merino Torres, F. Nuevas tecnologías en el seguimiento y control del paciente diabético. Editorial de la sociedad española de diabetes. Madrid 2007. Pp 68-97
51. Murali Dharan, M. S., Ph. D. Programa de control de calidad intralaboratorio. Editorial Reverté 1982. México. Pp. 75-99
52. Nakamura, M. et al. Suppressive response of confections containing the extractive from leaves of Morus Alba on postprandial blood glucose and insulin in healthy human subjects. Nutrition & Metabolism 2009; 6 (29): 1-36
53. Navarrete, P. S. et al. Toma de Muestra de Sangre mediante Punción Venosa. Hospital Regional Universitario Carlos Haya 2008; 1: 1-5
54. Niwano, Y. et al. Is Glycemic Index of Food a Feasible Predictor of Appetite, Hunger, and Satiety. J Nutr Set Vitaminol 2009; 55: 201-207
55. NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes.
56. Nora, B. et al. Interrelaciones Metabólicas. Facultad de Medicina U.N.N.E. 2002: 1-23
57. Oda, E. et al. Very Low Levels of High-sensitivity C-reactive Protein are not Bimodally Distributed but are Significantly Related to Other Metabolic Risk Factors in Japanese. Inter Med 2009; 48: 953-958
58. Olaiz, F. G et al. Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. Salud Pública de México 2007; 49 (3): s331-s337
59. Park, J. Y. et al. Pathologic Changes and Glucose Homeostasis According to Expression of Human Islet Amyloid Polypeptide in Tipe 2 Diabetic Patients. JHC express 2010; 10: 1-43

60. Peterson, A. K. et al. Mejoras para la atención médica de la diabetes en la práctica. Diabetes Care 2009; 10 (4): 99-104
61. Picón César, M. J., Ruíz de Adana, M. Tecnologías Aplicadas a la Diabetes. Editorial Sociedad Española de Diabetes. Madrid 2009. Pp. 53-84
62. Pijl, M. et al. Efectos de la comunicación de riesgo familiar de diabetes en las percepciones de la enfermedad y los resultados de conducta auto-informados. Diabetes Care 2009; 10 (5): 155-157
63. Planta, P. R. et al. Diabetes Gestacional. Guías Clínicas 2005; 5 (37): 1-3
64. Polit, F. D., Hungler, R. N. Investigación Científica en Ciencias de la Salud. 5ª edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. México 1997. Pp. 257-273, 347-369, 373-399
65. Polo Martín, M. et al. Correlación entre glucemia capilar y venosa en urgencias: un apunte metodológico. Emergencias 2008; 20: 332-334
66. Portillo, E. P. El uso de Monitores Electrónicos en el Cuidado de la Diabetes. inFARMAte 2007; 2 (11): 11-16
67. Rakoff, H., Rose, N. Química Orgánica Fundamental. 13ª edición. Editorial Limusa. México 1991. Pp. 751-808
68. Rodríguez, M. J. et al. Características epidemiológicas de pacientes con diabetes en el Estado de México. Rev Med IMSS 2003; 41 (5): 383-392
69. Sampieri, R. H. et al. Metodología de la investigación. 2ª edición. Editorial Mc Graw Hill. México 2000. Pp. 341-423
70. Santiago, N. A. Definición, Clasificación clínica y Diagnóstico de la Diabetes Mellitus. Documentos clínicos Semergen 2009: 7-12

71. Sherwin, S. R. et al. Glucose homeostasis during prolonged suppression of glucagon and insulin secretion by somatostatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977; 74: 348-352
72. Silva, A. E. et al. Impact of abdominal fat and insulin resistance on arterial hypertension in non-obese women. Arq. Bras Endocrinol Metab. 2009; 53 (3): 340-343
73. Terrés-Speziale, H. A. Evaluación de tres estudios internacionales para comparar el impacto del tratamiento intensificado vs. El manejo convencional de pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 1 y 2. Diabetes Hoy para el médico y el profesional de la salud 2003; 4 (1): 1010-1016
74. Traducción de patente Europea. Aparato para la medición y el control del contenido de glucosa, lactato y otros metabolitos en fluidos biológicos. Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid 2006: 1-10
75. Udayakumar, R. et al. Hypoglycaemic and Hypolipidaemic Effects of *Withania somnifera* Root and Leaf Extracts on Alloxan-Induced Diabetic Rats. Int. J. Mol. Sci. 2009; 10: 2367-2382
76. Urquizo, A. G. et al. Detección temprana de Diabetes Mellitus mediante Campañas Masivas. Revista Médica-organo oficial del Colegio de la Paz, 2003; 9 (3): 7-10
77. Valérie, L. et al. Differential Gene Expression in Well-Regulated and Dysregulated Pancreatic β -Cell (MIN6) Sublines. Endocrinology 2003; 144 (4): 1368-1379
78. Vallis, M. Obstáculos para el autocontrol en personas afectadas por una enfermedad crónica. Diavetes Voice 2009; 54: 5-8
79. Vela, A. et al. Monitorización continua de la glucosa en la edad pediátrica: indicaciones y aplicación clínica de los resultados. Av Diabetol 2007; 23 (4): 282-287

80. Voet, D. Bioquímica. Editorial Omega. Barcelona 1992. Pp. 456-516, 528-539
81. Yan-Hua, H. et al. A secretory function of human insulin-producing cells *in vivo*. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009; 8 (3): 255-260
82. Zavala, L. G. et al. Factores de Riesgo en Alteraciones de Glucemia en Población Garífuna Mayor de 15 años en Travesía, Cortés, en Mayo 2007. *Rev. Fac. Cienc. Méd.* 2007: 9-22