(43)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ALTERACIONES DE LOS ACIDOS GRASOS LIBRES EN LA DIABETES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

Enriqueta Victoria Rapaport Simkova

1 9 7 3

M-172420

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

A mis Padres:
JULIO RAPAPORT
CRISTINA SIMKOVA.

Con amor infinito.

A mi hermana:
JULIETA RAPAPORT.

Con todo mi cariño filial.

A mi amiga:
ELSA MENDOZA MORALES.

Con agradecimiento infinito por su desinteresada amistad y el estímulo que siempre me ha brindado.

A mi Maestra:
DEA CORONADO P.

Sin cuya cooperación no hubiera sido posible la elaboración de esta Tesis.

A mis amigos:

Con cariño y reconocimiento por su amistad leal.

Jurado signado originalmente según el tema:

PRESIDENTE : Prof. FERNANDO VELEZ OROZCO.
VOCAL : Prof. JUAN JOSE MANDOKI WEIZTNER.
SECRETARIO : Prof. DEA CORONADO PERDOMO.
1er. SUPLENTE : Prof. RAMON GUEVARA ESTRADA.
2o. SUPLENTE : Prof. MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO.

Sitio donde se desarrolló el tema: De MYLE, CONSULTORIAS MEDICAS, LABORATORIO.

MANZANILLO # 100-103, COL. ROMA.

Nombre del sustentante:

ENRIQUETA VICTORIA RAPAPORT SIMKOVA.

Asesor del tema:

DEA CORONADO PERDOMO.

INDICE

CAPITULO I - INTRODUCCION.

CAPITULO II - GENERALIDADES.

CAPITULO III - MATERIAL Y METODOS.

CAPITULO IV - RESULTADOS.

CAPITULO V - RESUMEN.

CAPITULO VI - CONCLUSIONES.

CAPITULO I

INTRODUCCION

El estudio de los metabolismos lipídico, proteico y de carbohidratos, nos ha llevado a dilucidar el mecanismo por el cual se presentan muchas enfermedades de tipo no infeccioso y por lo tanto, a su curación parcial o total; asimismo, los métodos de diagnóstico día a día prosperan gracias al conocimiento íntimo de estos metabolismos y de las sustancias que de ellos derivan y que aparecen elevadas en un momento determinado de la enfermedad ya sea en sangre, en orina, en heces o en Líquido Cefalorraquídeo o la aparición de sustancias anormales en estos productos.

Cada día se cuenta con mejores técnicas para determinar cada una de estas sustancias, gracias a lo cual, se han podido establecer las interrelaciones existentes entre los tres metabolismos principales, con lo que se han descubierto métodos "indirectos" de diagnóstico, es decir, por medio de la determinación de sustancias derivadas de uno de los tres metabolismos, encontrar la falla existente en cualquiera de los otros dos.

En el presente trabajo, trataremos de exponer la íntima relación existente entre el metabolismo de carbohidratos y el metabolismo lipídico y de esta manera trataremos de explicar el porqué el nivel de Acidos Grasos Libres teóricamente se eleva en el plasma de personas que padecen diabetes mellitus en comparación con el nivel de Acidos Grasos Libres en plasmas de personas "clínicamente sanas" y su posterior demostración práctica, por medio de la determinación de los niveles de Acidos Grasos Libres (AGL) en 50 casos de personas normales y 50 casos de personas diabéticas, haciendo su comparación posterior.

Se expone a la vez, un método sencillo y rápido

para la determinación de AGL en plasma o suero.

Las determinaciones fueron realizadas en plasmas obtenidos utilizando EDTA como anticoagulante, ya que éste es, en general, el anticoagulante más utilizado al efectuar las determinaciones de glucosa por lo cual, con las muestras así obtenidas se pudieron efectuar simultáneamente las determinaciones de glucosa y de AGL, observando la relación existente entre ellos.

Al mismo tiempo, se hace la determinación de las variaciones resultantes al utilizar diferentes anticoagulantes, en este caso, se tomaron varias muestras con EDTA y con heparina con anticoagulante así como suero, de las mismas personas y se hicieron las determinaciones simultáneas en los tres productos.

CAPITULO II

GENERALIDADES

Para podernos explicar las relaciones que existen entre el metabolismo de lípidos y el de carbohidratos y las alteraciones que ocasiona en uno de ellos fallas en el otro, debemos tener bien claros cada uno de los pasos que se realizan en los dos metabolismos, por lo que primeramente, trataremos de detallar someramente el metabolismo de carbohidratos y después el de lípidos, especialmente en lo que se refiere a ácidos grados libres.

CARBOHIDRATOS:

1) Definición de Carbohidrato.- El término carbohidrato quiere decir hidrato de carbono, y deriva de la observación de que las fórmulas empíricas de estos compuestos contienen aproximadamente una molécula de agua por átomo de Carbono; en terminología más descriptiva, los carbohidratos se definen como los derivados aldehídicos o cetónicos de alcoholes polihidroxilados, así, la glucosa es un azúcar de 6 carbonos (una aldosa) y la fructuosa es una cetosa de 6 carbonos.

2) Metabolismo de Carbohidratos.- El almidón -(polímero de glucosa que se encuentra en vegetales) y el glucógeno (polímero de glucosa que se encuentra en animales), son parcialmente digeridos en la boca por la acción de la amilasa salival, con formación de dextrinas intermedias y maltosa. La actividad de la amilasa salival es inhibida al llegar al pH ácido del estómago y al pasar al intestino delgado, aumenta el pH por el jugo pancreático alcalino y la amilasa pancreática efectúa la digestión del almidón y glucógeno a maltosa, la cual, junto con lactosa y sacarosa ingeridas, es desdoblada por la disacaridasa de la mucosa intestinal con formación de los monosacáridos glucosa, galactosa y fructosa

Estos monosacáridos son absorbidos hacia la vena porta de donde son transportados al hígado. Según las necesidades del cuerpo, los carbohidratos pueden convertirse en glucógeno y ser almacenados en esta forma por el hígado, metabolizarse por completo a CO_2 y agua para proporcionar energía inmediata, convertirse en cetoácidos, aminoácidos y proteínas o convertirse en grasa y almacenarse como tejido adiposo.

El hígado con el concurso de los órganos que regulan el metabolismo de carbohidratos efectúa la:

a) Glucogénesis, que es la conversión de glucosa en glucógeno.

b) Gluconeogénesis, que es la formación de glucosa de fuentes diferentes a los carbohidratos como aminoácidos, glicerol o ácidos grasos.

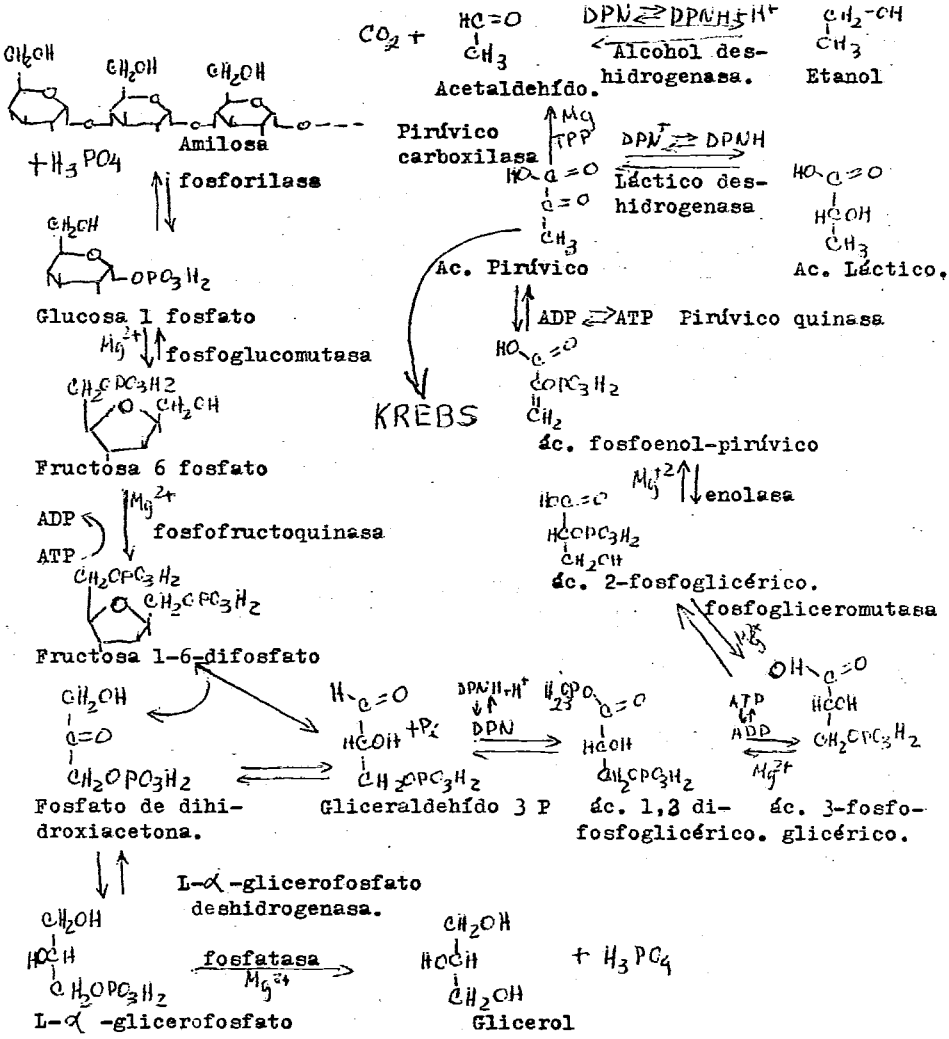
c) Glucogenogenolisis, es la descomposición del glucógeno para formar glucosa y otros productos intermedios.

d) Glicolisis, es la conversión de glucosa o de otras hexosas en lactato o piruvato y CO_2 † agua.

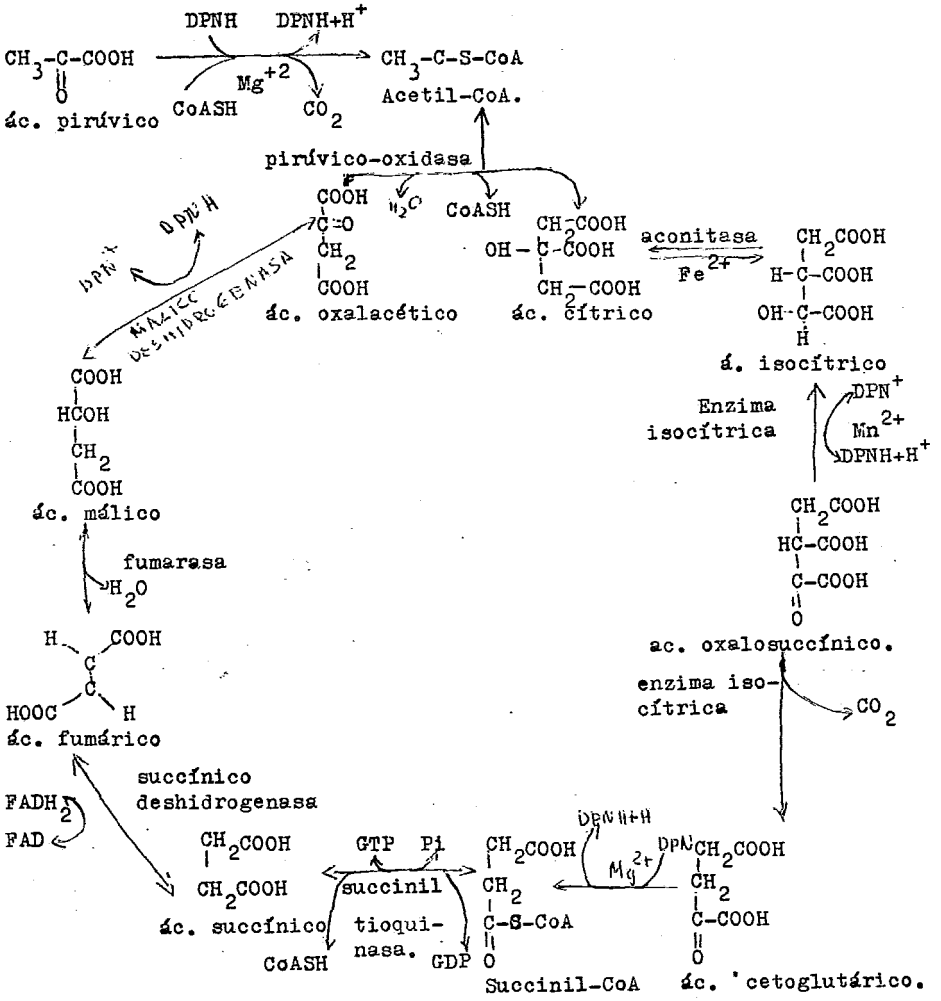
El resultado neto de los efectos de factores que afectan estos diversos procesos, determina el nivel de glucosa en sangre.

El metabolismo intermedio de carbohidratos, se ilustra en el siguiente esquema:

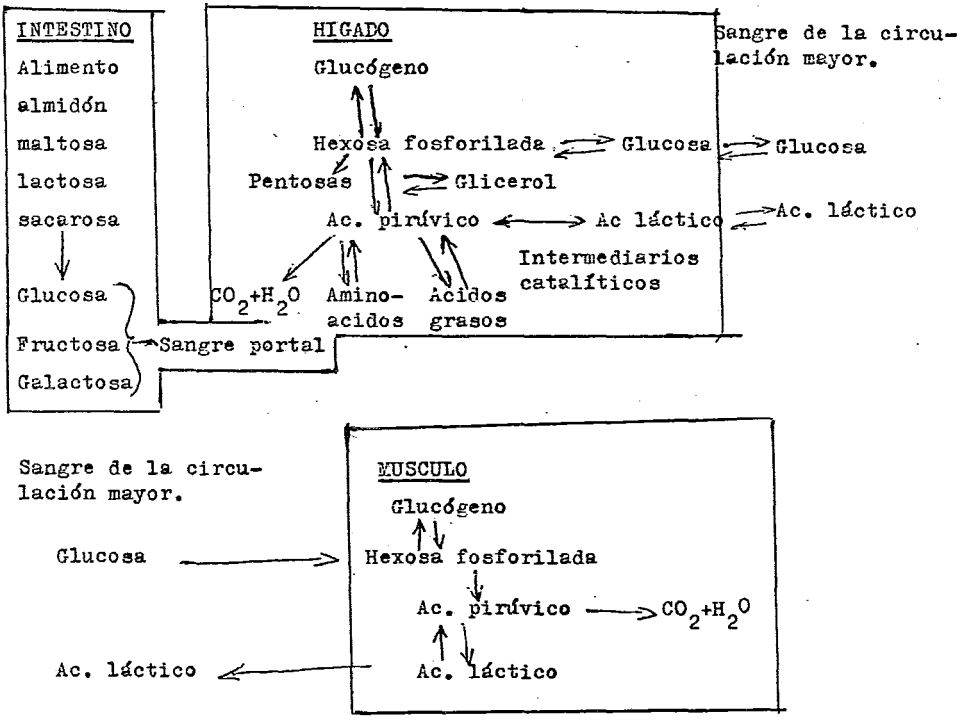
a) METABOLISMO ANAEROBIO DE LA GLUCOSA.- Ciclo de "Embden-Meyerhof":



La segunda parte del metabolismo de carbohidratos, está representado por el Ciclo de Krebs ó Ciclo de los Acidos tricarboxílicos que es un sistema aerobio:



FUENTES Y VIAS PRINCIPALES DE LA UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS.



LIPIDOS

Definición.- El término lípido comprende las grasas y numerosas sustancias de estructura química diversa, parecidas en sus propiedades físicas a las grasas, los lípidos se definen como sustancias que:

a) Son solubles en los llamados "solventes de las grasas o solventes orgánicos", como el éter, cloroformo, alcohol caliente, éter de petróleo, bisulfuro de carbono, etc., siendo además la mayoría de ellas, insolubles en agua.

b) Son ésteres o sustancias capaces de formar ésteres, y

c) Suelen tener funciones útiles en el organismo animal, sea de tipo estructural o como productores de energía.

La utilidad biológica de las grasas es variable. Las grasas neutras constituyen un amortiguador físico y aislador de la temperatura corporal, las grasas forman amplias reservas energéticas, tanto por su gran valor calórico como porque se pueden acumular en los tejidos adiposos en forma prácticamente pura, las grasas neutras y sobre todo, los lípidos compuestos, tienen propiedades estructurales y realizan funciones importantes en el metabolismo, otras sustancias asociadas a los lípidos como las hormonas esteroides, las vitaminas liposolubles, etc., tienen funciones específicas.

Clasificación general de los lípidos:

a) Lípidos simples.- Contienen ácidos grasos y algún tipo de alcohol con el cual se esterifican.

b) Lípidos compuestos.- Tienen, aparte del alcohol y los ácidos grasos, otras sustancias como ácido fos

fórico, bases nitrogenadas o carbohidratos.

Acidos Grasos.- Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos cuyo radical alquilo representa estructura de hidrocarburo que en la mayoría de los casos, es lineal y no muestra ramificaciones. Los ácidos grasos se disocian liberando el hidrógeno de su grupo carboxilo; sin embargo, el grado de disociación es relativamente bajo, con un pK entre 4 y 5 y no siempre pueden demostrarse sus propiedades ácidas por ser, en su mayor parte, insolubles en agua.

Los ácidos grasos importantes en la alimentación son, en general, ácidos grasos de cadena larga, que varía de 16 hasta 24 átomos de Carbono, con número par de átomos de C ya que los que tienen número impar como el fórmico, sólo existen de manera fugaz en ciertos pasos del metabolismo intermedio.

Los ácidos grasos pueden ser insaturados, monoinsaturados o poliinsaturados, así como saturados. El hombre no puede sintetizar los ácidos grasos altamente insaturados, por lo que en la dieta requiere suministro de los ácidos linoleico, linolénico y araquidónico, llamados "ácidos grasos esenciales", los cuales son abundantes en los alimentos naturales.

METABOLISMO DE LIPIDOS

La entrada de los alimentos al intestino, produce la liberación de dos hormonas, la secretina y la colecistoquina, que van a determinar la salida de los jugos pancreático y biliar respectivamente. Prácticamente toda la digestión de la grasa ocurre en el intestino delgado:

La primera etapa consiste en desintegrar los grandes glóbulos de grasa en glóbulos menores, de manera que las enzimas digestivas hidrosolubles puedan actuar sobre la superficie de las mismas, este proceso se llama emulsión de la grasa y se logra por influencia de la bilis-

secretada por el hígado, que contiene gran cantidad de sales biliares (sobre todo en forma de sales de sodio ionizado) muy importante para la digestión de la grasa. El carboxilo de la molécula de sal biliar es muy soluble en agua y el esterol lo es en la grasa, por lo tanto, las sales biliares se concentran en la superficie de las gotitas de grasa del contenido intestinal, con el esterol disuelto en la misma grasa, mientras que el carboxilo se proyecta hacia el exterior de la gota y se disuelve en los líquidos vecinos; así, disminuye la tensión superficial de las grasas y por lo tanto, la función de las sales biliares es facilitar la división de las gotas de grasa en el intestino delgado.

La lipasa pancreática o esteapsina, actúa sobre los glicéridos al llegar al intestino después de ser vertida por el páncreas, su actividad aumenta de modo considerable debido, sobre todo, a la influencia de las sales biliares. El pH óptimo de la enzima oscila entre 6 y 9 y depende en parte, del tipo y estructura química de los ácidos grasos del triglicérido que ataca.

La hidrólisis de la grasa neutra produce una molécula de glicerol más tres moléculas de los ácidos grasos correspondientes, la lipasa produce inicialmente los digli céridos 1, 2 y 2,3 y por fin, el monoglicérido 2. Los monoglicéridos aunándose a la actividad general de las sales biliares (el ácido glicocólico y el ácido taurocólico) y de los jabones que se forman en el intestino, producen la emulsión de las grasas.

Cuando suelen faltar las sales biliares, casi toda la grasa se expulsa por las heces sin modificarse.

Los productos finales de la digestión de grasas son: ácidos grasos, glicerol y glicéridos. Los glicéridos constan de un núcleo de glicerol al que están unidas una o dos cadenas de ácidos grasos.

Aunque la finalidad de la digestión de grasas es

desdoblarlas por completo en ácidos grasos y glicerol, - sólo ocurre así aproximadamente en un 40% de las moléculas, por lo que quedan muchos glicéridos entre los productos de la digestión.

Los productos finales de la digestión de grasas, - son absorbidos por las vellosidades de la mucosa intestinal, parte importante de los ácidos grasos liberados son- recombinados en las propias células de la mucosa, con — glicerol y otros compuestos de 3 carbonos (dihidroxiacetona por ejemplo), para resintetizar las grasas neutras las- cuales, en esta forma, entran a la circulación propiamente dicha. Es importante hacer notar que el glicerol utilizado en la nueva síntesis de lípidos no es el recién absorbido del intestino, este glicerol se convierte en glucosa y otros productos, las enzimas que catalizan la formación de triglicéridos sólo pueden transferir ácidos grasos li-- bres a ácido glicerofosfórico, no a glicerol libre.

La absorción de grasa se produce por virtud de un- proceso activo, los ácidos grasos y glicéridos como son solubles en la membrana celular, simplemente difunden - hacia el interior de la célula de la mucosa, donde son absorbidos activamente por el retículo endoplásmico celu-- lar, desde donde pasan hacia el líquido intersticial y de ahí a los quilíferos centrales de las vellosidades, como- quilomicrones.

La linfa es vertida del vazo quilífero central hacia los linfáticos abdominales, por la contracción rítmica de- las vellosidades y depende de una hormona, la vilicinina que es producida por la mucosa intestinal cuando hay grasas en el quimo.

Después de salir del vaso quilífero central, la - grasa neutra es transportada por el conducto torácico ha— cia la circulación sanguínea y desemboca en la unión de las venas yugular y subclavia, por este camino no son - absorbidas las grasas neutras.

Los ácidos grasos de cadena corta, tienden a atravesar el intestino y alcanzar la vena porta, los de tamaño intermedio, de 10 ó 12 carbonos, parte entra directamente a la vena porta y otra parte, en forma de quilomicrones, pasa por la vía linfática.

Al llegar los quilomicrones por la vía del conducto torácico hasta la unión de las venas subclavia y yugular, son vertidos en la sangre causando la lipemia.

La desaparición de los quilomicrones del plasma, se debe a 2 mecanismos diferentes:

a) Hidrólisis de los triglicéridos de los quilomicrones por la lipasa lipoproteica, la cual transforma los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol, el glicerol es metabolizado en forma parecida a la glucosa y los ácidos grasos son llevados en combinación con albúmina a las distintas células del cuerpo, allí se pueden oxidar para producir energía o ser empleados por las células grasas del tejido adiposo para volver a formar triglicéridos que se almacenan en las células grasas.

b) Absorción del quilomicrón entero por las células hepáticas.

La heparina provoca liberación hacia la sangre de gran cantidad de lipasa lipoproteica originada en el tejido adiposo, músculo, etc. La lipasa lipoproteica recibe el nombre de "factor aclarante".

En estado post-absortivo, la mayor parte de los lípidos se encuentran unidos a proteínas formando lipoproteínas, los ácidos grasos libres son captados por la albúmina.

Transporte de grasas en los líquidos corporales, Acidos Grasos Libres.- Casi toda la grasa es transportada en la sangre bajo la forma de ácidos grados libres,

que son una combinación de ácidos grasos con albúmina del plasma, la ionización de los ácidos grasos en agua es considerable por lo cual, cuando penetran en la sangre ácidos grasos liberados por la acción de la lipasa lipoproteica sobre los quilomicrones o triglicéridos o de los depósitos grasos del organismo, los ácidos grasos ionizados se combinan casi de inmediato con proteínas plasmáticas; estos ácidos grasos unidos a proteínas se llaman Acidos Grasos Libres (AGL), o Acidos Grasos No Esterificados (AGNE) (o Non Esterified Fatty Acids (NEFA)), para distinguirlos de los demás, que se encuentran en forma de ésteres de glicerol, colesterol u otras sustancias.

Los ácidos grasos unidos a albúmina de la sangre, son transportados a varios tejidos donde se separan de la albúmina, algunos se combinan con glicerol en las zonas de depósito de grasa, formando nuevas grasas neutras, otros entran a las células tisulares donde son desdoblados para suministrar energía.

Aunque casi todo el transporte de grasa en el cuerpo tiene lugar en forma de AGL, éstos se hallan en la sangre en una concentración de 20 a 40 mgs.; y los ácidos grasos son transportados a su destino en pocos minutos, por lo que pueden aportar grandes cantidades de energía a las células. Cuando la concentración sanguínea de ácidos grasos aumenta 4 veces o más, ésto es un indicio de que las grasas están siendo utilizadas en grandes cantidades por las células. Esta situación se presenta en inanición, diabetes, cuando el cuerpo carece de carbohidratos o no puede utilizar debidamente los que posee para obtener energía.

Síntesis de grasa a partir de glucosa y proteínas: Parte importante de la grasa corporal no deriva directamente de los alimentos, sino que es sintetizada en el organismo. Las mismas células adiposas pueden elaborar una pequeña cantidad de grasa, pero casi toda es sintetizada en el hígado y después llega a las demás células.

La fuente más importante es la glucosa.

Mientras se disponga de glucosa suficiente para satisfacer las necesidades energéticas de las células, se utilizará de preferencia a los cetoácidos y cuando la glucosa exceda a la necesaria, la demasía se convierte en grasa, si hay glucosa disponible cesa la combustión de grasas.

Las funciones principales del hígado en el metabolismo de los lípidos son:

a) Desdoblar triglicéridos en compuestos pequeños que se puedan metabolizar para obtener energía.

b) Sintetizar triglicéridos, principalmente a partir de carbohidratos y en menor proporción a partir de proteínas.

c) Sintetizar otros lípidos a partir de triglicéridos. El hígado contiene gran cantidad de triglicéridos en las siguientes circunstancias:

1.- Durante la inanición
2.- En la diabetes sacarina.
3.- En otra situación donde esté aumentado el metabolismo de grasas para obtener energía.

En estas circunstancias los triglicéridos se movilizan del tejido adiposo y son transportados como AGL por la sangre y se depositan como triglicéridos en el hígado.

Obtención de energía a partir de Triglicéridos.- Los triglicéridos proporcionan las 2 terceras partes de la energía total producida por las células. La primera etapa de la utilización de triglicéridos en el metabolismo energético es su hidrólisis, con producción de glicerol y ácidos grasos; después el glicerol es transformado a gliceral

dehído que ingresa en el ciclo del fosfogluconato y produce energía. Los ácidos grasos, antes de ser utilizados deben ser desdoblados.

Biosíntesis y degradación de los ácidos grasos: El reconocimiento de la participación de la Coenzima A en la oxidación de los ácidos grasos, permitió conocer el mecanismo íntimo de su degradación. Más tarde se reafirmó el concepto de que la unidad característica en el catabolismo y formación de los ácidos grasos es la Acetil Coenzima A. Teniendo en cuenta el papel que desempeña la acetil coenzima A como substancia alimentadora del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, se llegó al conocimiento íntimo de la combustión final de los ácidos grasos, al entrar éstos al ciclo oxidativo donde terminan por convertirse en CO_2 y agua, liberando la energía correspondiente. Por otro lado, el hecho de que diversas reacciones que participan en la formación de la acetil coenzima A a partir de los ácidos grasos son reversibles, permitió reconocer el fenómeno inverso o sea el alargamiento de la cadena de ácido graso que partiendo de 2 ó 4 átomos de Carbono llega hasta 16, 18 y 20 Carbonos.

Sustracción de fragmentos de 2 carbonos, Beta oxidación: La oxidación total de los ácidos grados a CO_2 y agua se hace de una manera gradual a través de modificaciones químicas que se efectúan en el segundo carbono después del que lleva el grupo carboxilo, o sea, el carbono , por lo que a estas modificaciones se les ha llamado oxidación.

En la reacción inicial o activación del ácido graso, participa la coenzima A, ATP y un ácido graso y en ella se transfiere la energía presente en la molécula de ATP para introducir, a nivel del grupo Carboxilo del ácido graso, la molécula de la coenzima A. Se pierde en la reacción una molécula de agua y la energía del ATP se cambia íntegramente a la nueva agrupación acil-coenzima A que tiene una unión tioéster, lo que produce un

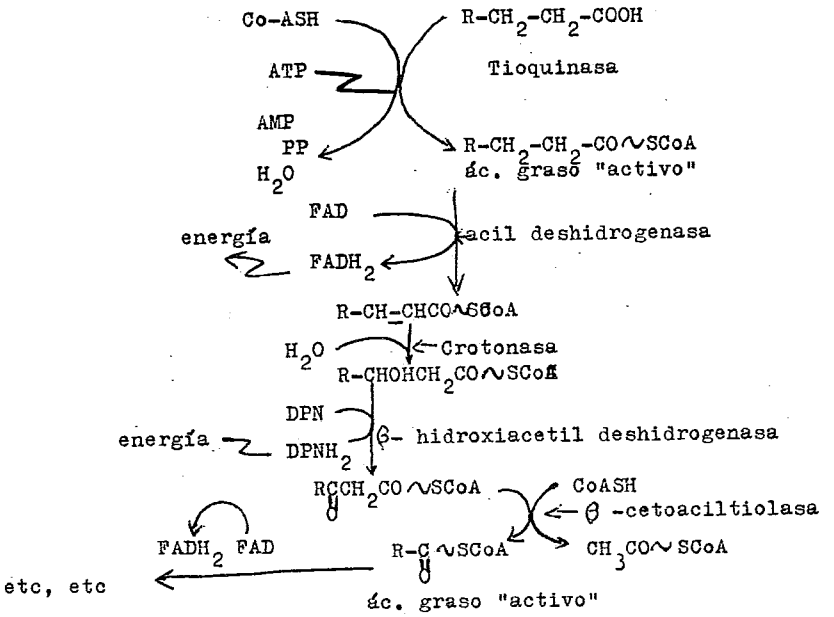
compuesto de alta energía.

Deshidrogenaciones.- Se efectúan por dos vías:

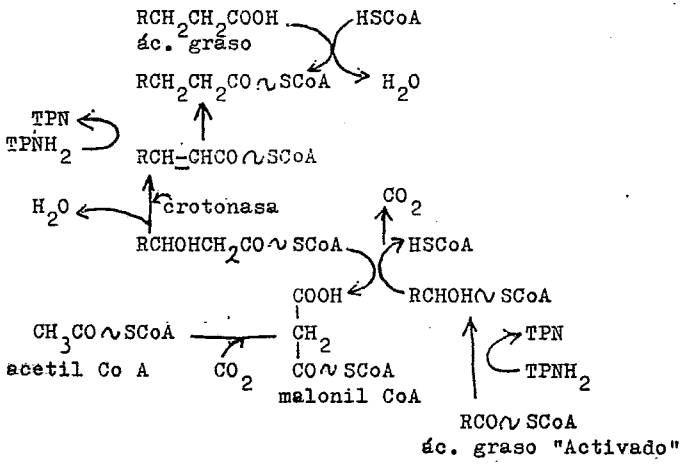
1.- Deshidrogenación directa de los carbonos saturados.

2.- Deshidrogenación previa introducción de una molécula de agua; realizándose las dos vías de deshidrogenaciones catalizadas por enzimas que funcionan, respectivamente, con FAD y DPN. En ambos casos, los hidrógenos así fijados siguen las reacciones de la cadena oxidativa con la correspondiente liberación de energía.

Liberación del fragmento de 2 Carbonos.- La segunda deshidrogenación distribuye la energía de la molécula quedando una unión de tipo β -cetoácido que da al compuesto alto valor energético. Este sitio de la molécula, con gran concentración de energía, reacciona con facilidad con una nueva molécula de coenzima A fragmentándose en dos partes, una molécula de acetil coenzima A que puede entrar al ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos y un radical de ácido graso acoplado a coenzima A (acil coenzima A), que es nuevamente un compuesto rico en energía, con una unión tioéster a partir del cual se reinicia el ciclo y representa la molécula original del ácido graso pero que ha perdido un fragmento de 2 Carbonos:



Biosíntesis de ác. grasos, Beta reducción:



La facilidad con que los lípidos actúan como material de reserva y las posibilidades de almacenamiento de grasa casi ilimitadas que tiene el organismo hacen que el equilibrio entre degradación y biosíntesis de ácidos grasos dependa en primer término del balance energético y calórico general del individuo, cualquier ingestión de carbohidrato o inclusive de proteína, por encima de las necesidades inmediatas, tiende a la biosíntesis de los ácidos grasos, los únicos ácidos grasos que no se sintetizan en proporción al exceso de calorías de la dieta son los ácidos grasos esenciales.

La actividad hormonal es el segundo factor de importancia que regula el equilibrio entre formación y oxidación de los ácidos grasos:

1) Hormonas adenohipofisiarias.- La hipófisis interviene de tal manera en la movilización de la grasa de los depósitos hacia el hígado, que algunos autores aceptan la existencia de un factor hipofisiario específico al que denominan "factor de movilización de lípidos" o "adipoquinina", distinto de la corticotropina y la hormona de crecimiento.

El aumento de grasa en el hígado determina, indirectamente, aumento en su degradación y por lo tanto, un aumento en la cetogénesis.

La adenohipófisis, por medio de la hormona de crecimiento modifica indirectamente el metabolismo de lípidos en virtud de su acción diabetogénica; el mecanismo de acción parece residir en la inhibición de la insulina que produce así una disminución en la utilización de carbohidratos y el organismo tiende a consumir grasa.

2) Corticoides suprarrenales.- Aumentan la cetogénesis (o sea la degradación de los ácidos grasos) y bloquean la síntesis de lípidos a partir de carbohidratos.

3) Insulina.- Aparte del efecto acelerador de la - oxidación de la glucosa:

a) Aumenta la cantidad de glucosa convertida en grasa.
b) Inhibe la cetogénesis.

La falta de insulina produce aumento de los lípidos en el hígado y en el plasma y aumento de la cetogéne-- sis, ya que la baja formación de ácidos grasos permite el acúmulo de los fragmentos de 2 carbonos y sus deriva-- dos inmediatos, los cuerpos cetónicos.

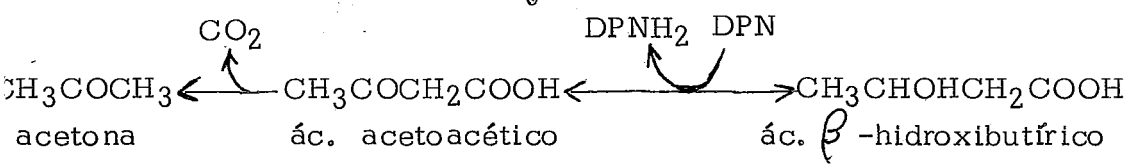
Cuerpos Cetónicos.- Durante la oxidación de los ácidos grasos, una parte variable de ellos aparece en el - sistema como ácido acetoacético, el tejido hepático es - el único que acumula ácido acetoacético, ya que no pue- de activarlo uniéndolo a la coenzima A. En estados de inanición o diabetes, se observa una oxidación incomple ta de ácidos grasos manifestada por la aparición de ácido acetoacético y sus derivados, ácido β -hidroxibutírico y acetona, llamados cuerpos cetónicos.

En los sujetos en inanición o diabéticos, domina la utilización de grasa por falta de carbohidratos, en esta situación, los ácidos grasos terminan por formar fragmen-- tos de 2 carbonos que no son oxidados a la velocidad - que se forman, en gran parte por la limitación de carbohi dratos y en vez de ello, se recondensan entre sí para - formar ácido acetoacético:

$$2\ CH_3COSCoA \longrightarrow CH_3COCH_2COSCoA + HSCoA$$

acetil CoA — Acetoacetil CoA

La acetoacetil CoA se convierte en acetoacetato- y éste en acetona y ácido β-hidroxibutírico:



En el hígado, cualquier proceso que impida la incorporación rápida de la acetil CoA al ciclo de Krebs, determina la formación de ácido acetoacético, su acumulación y su paso a la circulación donde será captado por los tejidos que pueden metabolizarlo, cuando se excede la capacidad de los tejidos periféricos para oxidar el ácido acetoacético producido en exceso por el hígado, se acumula en la circulación y aparece la cetosis.

De todo lo anteriormente dicho, podemos deducir que los Acidos Grasos Libres constituyen un factor clave en el mecanismo de transporte de lípidos. Están unidos a albúmina y representan el modo de transporte de los lípidos de los depósitos de grasa a los diversos tejidos entre ellos el hígado, para que allí sufran su oxidación final.

Cuando los ácidos grasos son liberados de las lipoproteínas por acción de la lipasa lipoproteica, éstos son captados por distintas células, allí son reconvertidos en grasas neutras u oxidadas de acuerdo con el estado local de requerimentos. En los tejidos existe lipasa lipoproteica la cual de modo constante está liberando ácidos grasos y glicerol a partir de grasas neutras, los ácidos grasos pasan nuevamente a la circulación y se adhieren a la albúmina que los transporta a diversos tejidos.

En estado de ayuno o cualquier situación que implique una demanda de grasas aumentada con fines de oxidación, aumenta la cantidad de AGL plasmáticos, así, en diabéticos que pueden considerarse como sujetos que oxidan las grasas de manera más activa que las personas normales, la concentración de los AGL está aumentada. La administración de glucosa con insulina logra la baja rápida de la concentración de los AGL en plasma, lo cual es posterior al descenso de la glucosa y permite al médico tener una mejor idea de la situación metabólica, pues --- mientras no hayan vuelto a la normalidad los AGL, ésto sugiere que el metabolismo sigue perturbado.

En la clínica es muy común la observación de hiperlipemia en los casos de diabetes mellitus; el aumento de lípidos comprende tanto el colesterol libre como el esterificado y de los ácidos grasos totales, esta elevación parece ser paralela a la gravedad de la enfermedad.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

A.G.L. Método: Duncombe.

1.- METODOS:

Hasta la fecha, la gran mayoría de métodos útilizados para la medición de AGL en plasma o suero, han sido métodos titrimétricos, como el de Dole, Trout, Davis, - en los que los AGL son extraídos del plasma con diferentes solventes, heptano e isopropanol (Trout), metanol- - cloroformo (Folch, Lees y Sloane-Stanley), heptano-etanol (Blankenhorn y Abrens), etc. y su posterior titula--- ción con NaOH de concentración conocida utilizando como indicador Azul de Timol (Dole), Timulftaleína (Trout) u otro indicador de la misma naturaleza.

Todos estos métodos, aunque exactos y bastante - precisos, son métodos laboriosos y cuyo costo es elevado, ya que necesitan microburetas especiales, corriente - de nitrógeno para llevar a cabo la titulación, ésto es --- con el objeto de evitar todo indicio de bióxido de carbono que podría consumir álcali diluído y falsear los resultados.

En 1962 Duncombe propuso un método colorimétrico para la determinación de ácidos grasos de cadena larga, eluídos de cromatogramas de papel, método basado - en el de Ayers (1956), quien midió la extinción de una - solución clorofórmica conteniendo jabones de cobre preparados por agitación de una solución de jabones de pota-- sio con nitrato de cobre y cloroformo.

En una modificación del método Iwayama (1959), utilizó un reactivo de nitrato de cobre-trietanolamina mezclado con cloroformo y que al reaccionar con los ácidos- grasos libres tuvo mayor sensibilidad. Después Ducombe, en sus trabajos de 1962, mejora el método añadiendo

a la solución de cloroformo y cobre de Iwayama uno de - los reactivos utilizados para la micro-determinación colorimétrica del cobre, se escogió para las investigaciones - el dietilditiocarbamato de sodio, que no es caro y es -- bastante sensible, las condiciones de la reacción no son críticas y el complejo colorido formado con cobre es solubre en cloroformo.

En 1963 el mismo Duncombe, expuso un trabajo - en el cual aplicó su método para la determinación de -- AGL en plasma, los resultados obtenidos con este método los comparó con los obtenidos en los mismos plasmas por el método de titulación de Gordon y encontró que no- había variación en ellos.

El método de Duncombe, no requiere de una ex-- tracción preliminar de lípidos, utiliza un pequeño volumen de plasma, la velocidad de la prueba y la simplificidad - general del análisis, son muy favorables.

En 1965 P.J.N. Howorth, S. Gubbard & Vincent - Marks, presentaron un trabajo en el cual midieron los - AGL de plasma por el método colorimétrico de Duncombe - y el método de titulación de Trout y compararon los re-- sultados, estos autores tomaron muestras de plasma de - pacientes diabéticos y no diabéticos utilizando citrato - sódico como anticoagulante. Calcularon el nivel de AGL del plasma por duplicado bajo los métodos Duncombe - usando 0.5 ml de muestra y Trout usando 1 ml de muestra del plasma.

Estos autores utilizaron inicialmente azul de ti-- mol como indicador y después lo sustituyeron por azul- - Nilo y encontraron que da mejor punto final en la titula-- ción, encontraron que la técnica colorimétrica de Duncombe alcanza un grado similar de precisión y recuperación - del ácido palmítico añadido al plasma como la técnica - titrimétrica de Trout, pero su especificidad no es idénti-- ca, ya que los AGL del plasma no constituyen un grupo -

homogéneo y los dos métodos emplean diferentes principios.

Mientras que la técnica titrimétrica mide todos los AGL extraídos del plasma por el solvente utilizado y los de cadena larga, influyen menos en el resultado, por su mismo peso molecular, el método colorimétrico mide predominantemente aquellos con cadena larga de C_{10}-C_{18} - con poca contribución de los de cadena corta.

Como podemos ver, los experimentos realizados - para comparar los resultados obtenidos por los métodos de titulación y el método colorimétrico de Duncombe, apoyan la idea de que este último es el método más indicado para uso rutinario en laboratorios clínicos por lo cual en este trabajo, fue utilizado el método Duncombe.

MATERIAL:

1.- Tubos de ensaye de 13 x 100, con tapón.
2.- Pipetas de 10 ml.
3.- Pipetas de 1 ml.
4.- Centrífuga.
5.- Fotocolorímetro (Coleman).
6.- Celdillas para fotocolorímetro.
7.- Pipetas pasteur, con bulbo y punta fina.

REACTIVOS:

1.- Cloroformo Q.P.
2.- Reactivo de cobre.- 9 volúmenes de Trietanolamina acuosa 1M, un volumen de ác. acético 1N y 10 volúmenes de $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ al 6.56% --- (P/V), (analítico).
3.- Reactivo de dietilditiocarbamato de sodio.- 0.1% (P/v) de dietilditiocarbamato de sodio (analítico) en sec-butanol redestilado.
4.- Patrón de ác. grasos libres conteniendo 0.5 mEq/ l.- Disolver 12.8 g de ác. palmítico puro en ---

100 ml de heptano, esta solución debe guardarse herméticamente cerrada para evitar la evaporación del solvente.

5.- Patrón de ác. grasos libres conteniendo 1 mEq/l.- Disolver 25.6 g de ác. palmítico puro en 100 ml de heptano. Guardar herméticamente cerrado.

MATERIAL BIOLOGICO.

Se obtuvieron 50 plasmas de personas normales, - utilizando EDTA como anticoagulante, en 12 de esas personas se obtuvo suero y plasma utilizando heparina como anticoagulante, con objeto de observar si había diferencias en los resultados al emplear distinto anticoagulante. El plasma se separó siempre antes de una hora después - de la toma y se mantuvo en refrigeración hasta la determinación.

FUNDAMENTO DEL METODO:

Los ácidos grasos reaccionan con el cobre dando - una sal soluble en cloroformo, midiéndose su concentración a través de la determinación del cobre en el cloroformo mediante el dietilditiocarbamato de sodio.

DESARROLLO DE LA TECNICA:

Tubos de ensayo con tapa:	B	T	M
Cloroformo.	5 ml.	5 ml.	5 ml.
Sol. patrón 0.5 mEq/l	---	0.2 ml.	---
Plasma o suero.	---	---	0.2 ml.
Sol. de cobre.	1 ml.	1 ml.	1 ml.

Tapar los tubos y agitar vigorosamente durante 5 minutos por lo menos, centrifugar durante 5 minutos. — Quitar la capa sobrenadante azul de cobre y agua utilizando una pipeta pasteur con bulbo y de punta fina sin romper la capa de proteínas formada.

Tubos de ensayo:	B	T	M
Capa clorofórmica.	2 ml.	2 ml.	2 ml.
Sol. dietilditiocarbamato de sodio	0.2 ml.	0.2 ml.	0.2 ml.

Mezclar y dejar reaccionar a la temperatura ambiente durante 10 minutos, leer a 445 mu llevando a cero — con el blanco.

CALCULOS:

$$\text{mEq/l de AGL} = \frac{\text{D.O. Muestra}}{\text{D.O. Patrón}} = X\ 0.5$$

Precauciones:

Puesto que en el cloroformo se determina cobre, - debe tenerse sumo cuidado de no dejar pasar absolutamente nada de la capa sobrenadante azul, de nitrato de cobre, pues ésto conducirá a error en la lectura con aumento en la concentración de los ácidos grasos libres y por- lo tanto un gran porcentaje de error.

Si el cloroformo no se encuentra puro, pasará parte de la capa acuosa de nitrato de cobre y, tanto el blanco como los problemas producirán falsas coloraciones -- que impiden la lectura correcta.

ESPECTRO DE ABSORCION DE COLOR:

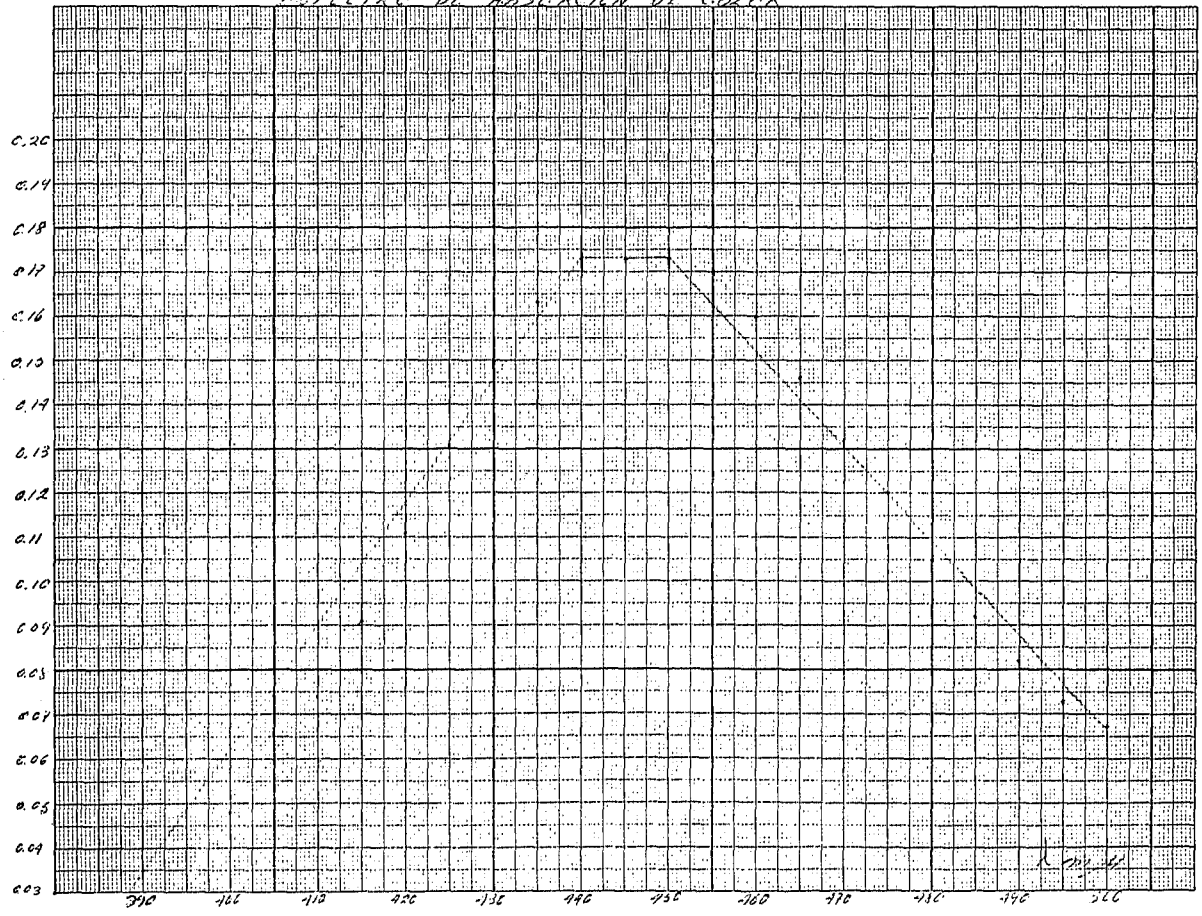
Con objeto de determinar la longitud de onda con una mayor absorción de color, se siguió la técnica descrita utilizando solamente el patrón de 0.5 mEq/l y se realizaron lecturas a varias longitudes de onda, observándose que la mayor absorción se encontraba situada entre --- 440 y 450 mu, por lo que todas las lecturas de problemas posteriores fueron hechas a esta longitud de onda; la curva obtenida fue la siguiente:

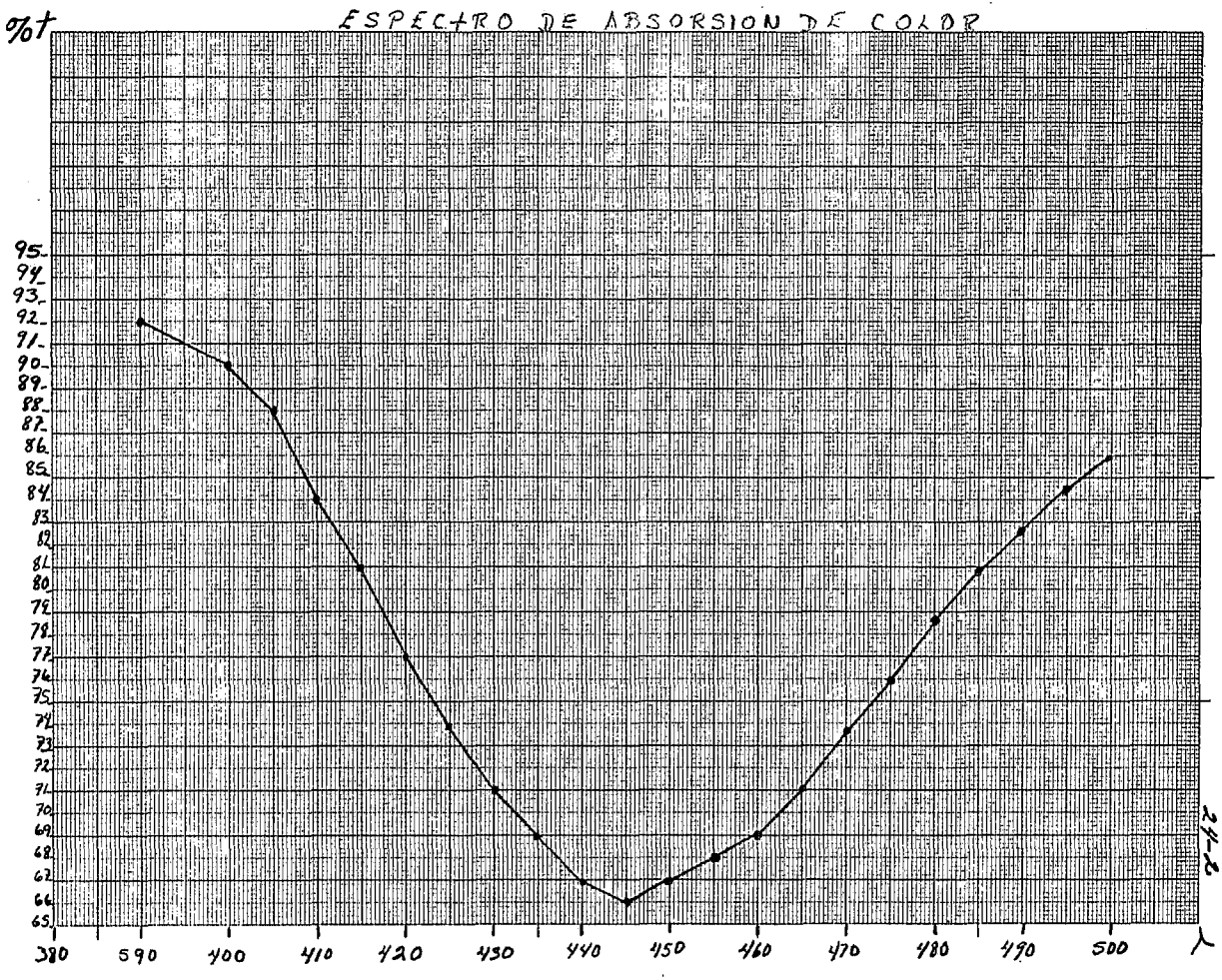
Longitud de Onda:	%T	D.O.
380	93.5	0.03
390	92.0	0.035
400	89.9	0.048
405	88.2	0.06
410	84.2	0.074
415	81.0	0.091
420	77.0	0.111
425	74.0	0.131
430	71.0	0.15
435	68.7	0.163
440	67.0	0.173
445	66.5	0.173
450	66.8	0.173
455	67.8	0.17
460	69.2	0.16
465	71.3	0.146
470	73.5	0.132
475	76.0	0.12
480	78.2	0.105
485	80.7	0.092
490	82.5	0.082
495	84.2	0.073
500	86.0	0.067

Todas las lecturas posteriores a la determinación de esta curva, fueron hechas a 445 mu.

D.O

ESPECTRO DE ABSORCION DE COLOR

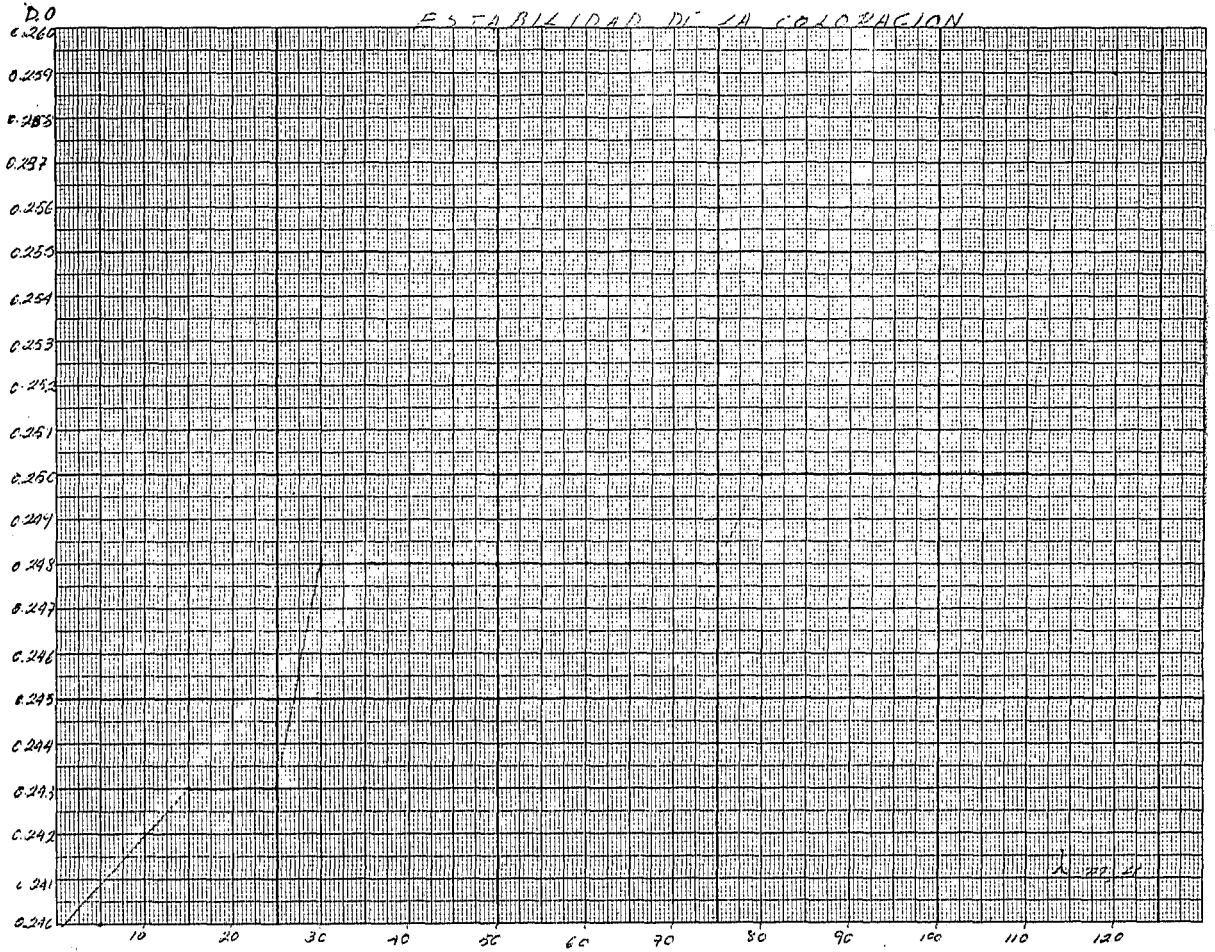


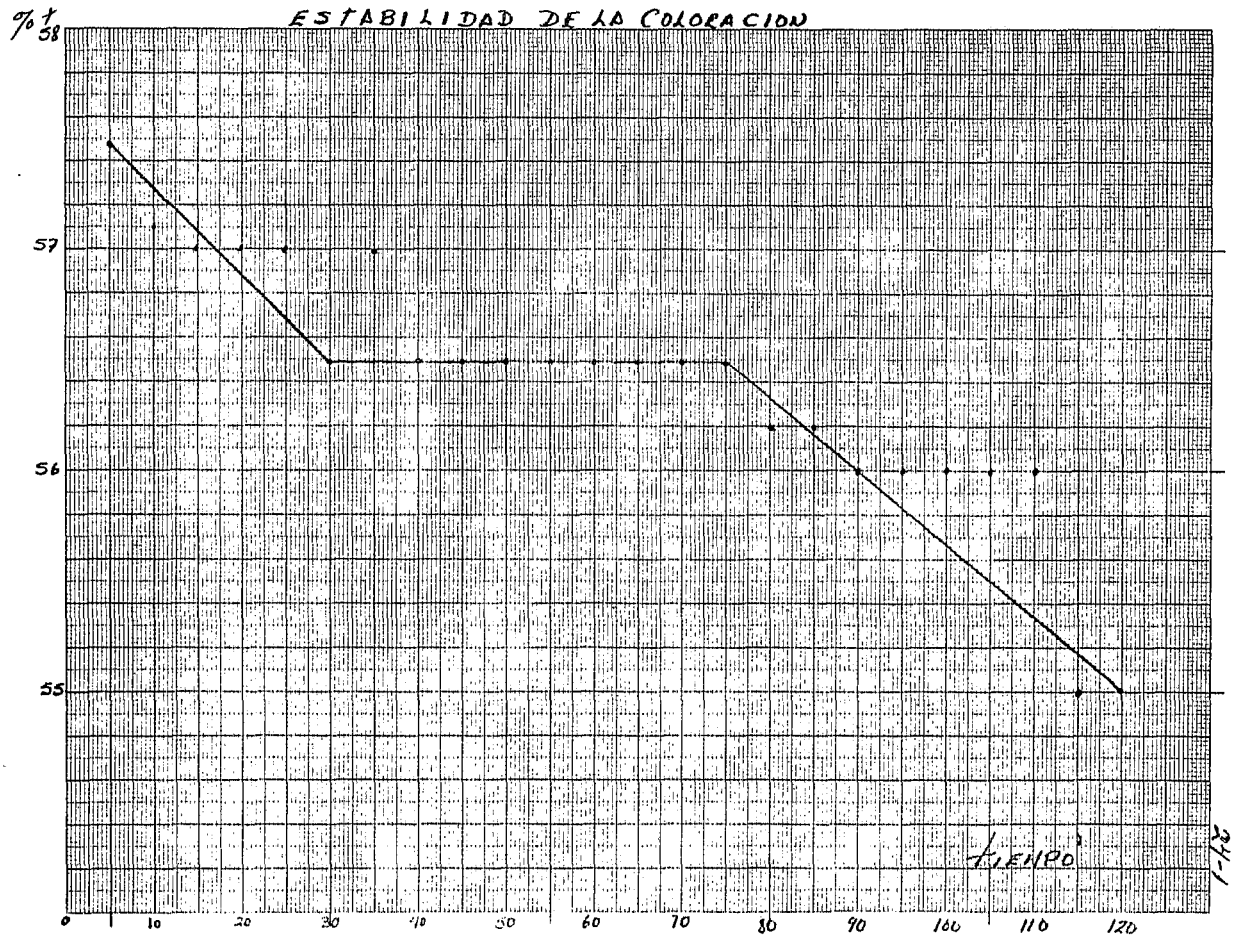

ESPECTRO DE ABSORSION DE COLOR
%t
95
94
93
92
91
90
89
88
87
86
85
84
83
82
81
80
79
78
77
76
75
74
73
72
71
70
69
68
67
66
65
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
λ
21-8

Por otro lado, con objeto de establecer la estabilidad de la coloración producida en la reacción, se leyó el mismo patrón utilizado en la determinación anterior a diferentes tiempos, obteniéndose la curva siguiente:

Tiempo de reacción:	%T	D. O. 445 mu.
5 minutos	57.5	0.24
10 "	57.1	0.242
15 "	57.0	0.243
20 "	57.0	0.243
25 "	57.0	0.243
30 "	56.5	0.248
35 "	57.0	0.243
40 "	56.5	0.248
45 "	56.5	0.248
50 "	56.5	0.248
55 "	56.5	0.248
60 "	56.5	0.248
65 "	56.5	0.248
70 "	56.5	0.248
75 "	56.5	0.248
80 "	56.2	0.25
85 "	56.2	0.25
90 "	56.0	0.25
95 "	56.0	0.25
100 "	56.0	0.25
105 "	56.0	0.25
110 "	56.0	0.25
115 "	55.0	0.259
120 "	55.0	0.259

De donde podemos deducir, que la coloración es estable por lo menos desde transcurridos los primeros 30 minutos hasta después de 75 minutos de llevada a cabo la reacción.


D.O
ESTABILIDAD DE LA COLOCACION
0.260
0.259
0.258
0.257
0.256
0.255
0.254
0.253
0.252
0.251
0.250
0.249
0.248
0.247
0.246
0.245
0.244
0.243
0.242
0.241
0.240
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
K = 22.2


% t
ESTABILIDAD DE LA COLORACION
58
57
56
55
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
1-12

CAPITULO IV

RESULTADOS

De las 12 personas normales a las que se le tomó - sangre usando EDTA, heparina y sin anticoagulante para obtención de plasmas y suero, los resultados obtenidos- en estas muestras fueron:

	Plasma EDTA	0.27 mEq/l
1)	Plasma heparina	0.46 "
	Suero	0.335 "
	Plasma EDTA	0.45 "
2)	Plasma heparina	0.715 "
	Suero	0.560 "
	Plasma EDTA	0.435 "
3)	Plasma heparina	0.67 "
	Suero	0.475 "
	Plasma EDTA	0.334 "
4)	Plasma heparina	0.57 "
	Suero	0.35 "
	Plasma EDTA	0.65 "
5)	Plasma heparina	1.06 "
	Suero	0.78 "
	Plasma EDTA	0.855 "
6)	Plasma heparina	1.55 "
	Suero	1.20 "
	Plasma EDTA	1.20 "
7)	Plasma heparina	2.09 "
	Suero	1.35 "
	Plasma EDTA	0.6 "
8)	Plasma heparina	0.75 "
	Suero	0.70 "

	Plasma EDTA	0.65	mEq/l
9)	Plasma heparina	0.85	"
	Suero	0.70	"
	Plasma EDTA	0.55	"
10)	Plasma heparina	0.65	"
	Suero	0.65	"
	Plasma EDTA	0.50	"
11)	Plasma heparina	0.80	"
	Suero	0.75	"
	Plasma EDTA	0.50	"
12)	Plasma heparina	0.65	"
	Suero	0.55	"

Como se puede observar, los valores más altos fueron los obtenidos cuando se utilizó heparina como anticoagulante, los más bajos cuando se utilizó EDTA y los valores intermedios correspondieron al suero, en otros 6 casos se determinó AGL tanto en suero como en plasma tomado con heparina y los valores obtenidos en el plasma continuaron siendo siempre mayores que en el suero; estas variaciones van desde un 7% hasta un 37% con los valores entre heparina y suero y desde un 8% hasta un 29% con los valores obtenidos en plasma con EDTA y suero, lo cual quiere decir, que si vamos a determinar valores normales, debemos escoger entre la determinación en suero, en plasma tomado con EDTA o plasma tomado con heparina, ya que si tratamos de obtener una normalidad sin tomar en cuenta el anticoagulante utilizado, ésto nos dará factores de error que debemos evitar, es por eso que en este trabajo se utilizaron plasmas obtenidos todos con EDTA.

VALORES NORMALES:

Los valores obtenidos con plasmas de personas normales de acuerdo con la edad, se muestran en la tabla siguiente:

	EDAD	mEq/l de AGL
0 a 10 años.	2 meses	0.38
	8 años	0.35
	12 años	0.54
	13 años	0.90
	15 años	0.65
	15 años	0.71
11 a 20 años.	16 años	0.44
	17 años	0.79
	17 años	0.85
	18 años	0.92
	19 años	0.27
	19 años	0.60
	20 años	0.86
	23 años	0.86
	24 años	0.475
	24 años	0.53
	25 años	0.55
21 a 30 años	25 años	0.91
	27 años	0.92
	27 años	1.0
	27 años	0.76
	28 años	0.75
	28 años	0.85
	30 años	0.30
	31 años	0.67
	32 años	0.34
	33 años	0.665
	34 años	0.60
31 a 40 años	34 años	0.72
	35 años	0.45
	37 años	0.65
	38 años	1.2
	39 años	0.65
	40 años	0.55

	EDAD	mEq/l de AGL
	42 años	0.65
	42 años	0.82
	43 años	0.44
41 a 50	43 años	0.48
años	45 años	0.96
	46 años	1.0
	46 años	1.05
	51 años	0.67
	53 años	0.70
51 a 60	55 años	0.335
años	55 años	0.50
	58 años	1.0
	59 años	0.67
61 a 70	61 años	0.75
años	63 años	0.70
71 a 80 años	71 años	1.15

Como podemos observar en estos 50 casos, no -- existe una relación constante entre la edad y la concen-- tración de ácidos grasos libres, ya que en todas las eda- des se presentan casos con una concentración relativa-- mente baja y casos con concentraciones elevadas, obte- niendo un rango de normalidad entre 0.27 y 2.10 si to-- mamos en cuenta todos los casos estudiados.

Con respecto a los plasmas de personas diabéti-- cas éstos, al igual que los plasmas obtenidos para esta- blecer los niveles normales de ácidos grasos libres, fueron tomados utilizando EDTA como anticoagulante y los valo- res obtenidos, tomando en cuenta en cada caso los nive- les de glucosa sanguínea, determinados por el método del ferricianuro alcalino (autoanalizador) que tiene como nive les normales de 50 a 100 mg%, fueron los siguientes:

	NIVEL DE GLUCOSA mg%	AGL mEq/l:		NIVEL DE GLUCOSA mg%	AGL mEq/l:
1.-	138	0.38	26.-	220	1.08
2.-	138	0.75	27.-	240	1.21
3.-	140	0.30	28.-	240	0.75
4.-	144	1.00	29.-	240	0.65
5.-	158	0.55	30.-	240	0.30
6.-	160	0.50	31.-	240	1.30
7.-	176	0.51	32.-	250	0.60
8.-	178	0.48	33.-	252	0.76
9.-	182	0.60	34.-	254	1.30
10.-	183	1.00	35.-	256	0.55
11.-	188	0.75	36.-	256	0.82
12.-	188	1.10	37.-	258	0.64
13.-	192	1.10	38.-	258	0.75
14.-	193	0.80	39.-	260	0.65
15.-	196	0.55	40.-	262	0.86
16.-	198	0.67	41.-	265	0.44
17.-	198	1.00	42.-	272	0.71
18.-	200	1.05	43.-	274	0.50
19.-	200	0.65	44.-	280	0.65
20.-	205	0.75	45.-	280	0.61
21.-	205	0.95	46.-	288	0.95
22.-	210	0.73	47.-	290	0.31
23.-	212	0.75	48.-	292	0.85
24.-	218	0.55	49.-	300	1.85
25.-	220	0.85	50.-	310	0.815

Como puede observarse, aunque la mayoría de los valores se encuentran ligeramente por encima de los valores encontrados en plasmas normales, no se encuentra una relación definida y directa entre la concentración de glucosa y la concentración de AGL, si bien, encontramos valores hasta de 1.85 mEq/l y varios valores que caerían dentro del límite superior de los valores obtenidos en plasmas normales mientras que ninguno cae dentro del límite inferior (el valor más bajo fue de 0.30 mEq/l),

mientras que en los plasmas normales se obtuvieron va--- rios valores semejantes e incluso más bajos).

Obtención estadística de los valores normales, media aritmética, desviación estándar y límites de confianza de 95% (20) y comparación con valores resultantes - en plasmas de diabéticos:

Estadísticamente tenemos que el intervalo normal con un límite de confianza del 95% es:

INTERVALO NORMAL = $M \pm 2S$.

Donde M es la media aritmética obtenida de la - suma de todos los valores divida entre el número de de-- terminaciones; S es la desviación estándar, que se obtiene por la fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum d^2}{N-1}}$$

En la que $\sum d^2$ es la suma de los cuadrados de - las diferencias de cada valor con respecto a la media aritmética y N es el número de determinaciones hechas (valores obtenidos). Por lo tanto, para obtener los valores - normales, primeramente necesitamos sacar la media aritmética.

Tenemos que los 50 valores obtenidos son:

0.27	0.48	0.65	0.75	0.91
0.30	0.50	0.65	0.75	0.92
0.33	0.53	0.67	0.76	0.92
0.34	0.54	0.67	0.79	0.96
0.35	0.55	0.67	0.82	1.00
0.38	0.55	0.67	0.85	1.00
0.44	0.60	0.70	0.85	1.00
0.44	0.60	0.70	0.86	1.00
0.45	0.65	0.71	0.86	1.15
0.47	0.65	0.72	0.90	1.20

cuya suma es: 34.48 y cuya Media aritmética será:

$$M = \frac{34.48}{50} \qquad M = 0.69 \text{ mEq/l}$$

La desviación estándar se obtiene sacando primeramente las diferencias entre cada valor y la media y después elevando estas diferencias al cuadrado:

VALOR	d	d^2	VALOR	d	d^2
0.27	0.42	0.176	0.67	0.02	0.0004
0.30	0.39	0.152	0.67	0.02	0.0004
0.33	0.35	0.126	0.70	0.01	0.0001
0.34	0.35	0.122	0.71	0.02	0.0004
0.35	0.34	0.115	0.70	0.01	0.0001
0.38	0.31	0.096	0.72	0.03	0.0009
0.44	0.25	0.0625	0.75	0.06	0.0036
0.44	0.25	0.0625	0.75	0.06	0.0036
0.45	0.24	0.0576	0.76	0.07	0.0049
0.47	0.21	0.0462	0.79	0.10	0.0010
0.48	0.21	0.0441	0.82	0.13	0.0169
0.50	0.19	0.0361	0.85	0.16	0.0256
0.53	0.16	0.0256	0.85	0.16	0.0256
0.54	0.15	0.0225	0.86	0.17	0.0289
0.55	0.14	0.0196	0.90	0.21	0.0441
0.55	0.14	0.0196	0.86	0.17	0.0289
0.60	0.09	0.0081	0.91	0.22	0.0484
0.60	0.09	0.0081	0.92	0.23	0.0529
0.65	0.04	0.0016	0.92	0.23	0.0529
0.65	0.04	0.0016	0.96	0.27	0.0729
0.65	0.04	0.0016	1.00	0.31	0.0961
0.65	0.04	0.0016	1.00	0.31	0.0961
0.66	0.02	0.0006	1.00	0.31	0.0961
0.67	0.02	0.0004	1.00	0.31	0.0961
0.67	0.02	0.0004	1.15	0.46	0.2116
			1.20	0.51	0.2601

La suma de las diferencias al cuadrado será: 2.442

De donde la desviación estándar S será:

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{N-1}} \qquad S = \sqrt{\frac{2.442}{49}} \qquad S = \sqrt{0.05} = 23$$

INTERVALO NORMAL = M $\pm$ 2S

Intervalo normal = 0.69 $\pm$ 2(0.23)

INTERVALO NORMAL = 0.23 a 1.15 mEq/l

Estos valores normales encontrados por nosotros difieren bastante de los reportados por la literatura alemana que son entre 0.09 a 0.6 mEq/l.

Con respecto a los resultados obtenidos con plasma de personas diabéticas tenemos que los valores son:

VALOR mEq/l	d	d^2	VALOR mEq/l	d	d^2
0.30	0.46	0.2116	0.75	0.01	0.0001
0.30	0.46	0.2116	0.75	0.01	0.0001
0.31	0.45	0.2025	0.75	0.01	0.0001
0.38	0.38	0.1444	0.75	0.01	0.0001
0.44	0.32	0.1024	0.75	0.01	0.0001
0.48	0.28	0.0784	0.76	0.00	0.0000
0.50	0.26	0.0676	0.80	0.04	0.0016
0.50	0.26	0.0676	0.82	0.06	0.0036
0.51	0.25	0.0625	0.82	0.06	0.0036
0.55	0.21	0.0441	0.85	0.09	0.0081
0.55	0.21	0.0441	0.85	0.09	0.0081
0.55	0.21	0.0441	0.86	0.10	0.0100
0.55	0.21	0.0441	0.95	0.19	0.0361
0.60	0.16	0.0256	0.95	0.19	0.0361
0.60	0.16	0.0256	1.00	0.24	0.0576
0.61	0.15	0.0225	1.00	0.24	0.0576
0.64	0.12	0.0144	1.00	0.24	0.0576
0.65	0.11	0.0121	1.05	0.29	0.0841
0.65	0.11	0.0121	1.08	0.32	0.1024
0.65	0.11	0.0121	1.10	0.34	0.1156
0.65	0.11	0.0121	1.10	0.34	0.1156
0.68	0.08	0.0064	1.21	0.45	0.2025
0.71	0.05	0.0025	1.30	0.54	0.2916
0.73	0.03	0.0009	1.30	0.54	0.2916
0.75	0.01	0.0001	1.85	1.09	1.1881

La Media aritmética de estos valores será:

$$M = 0.761 \text{ mEq/l}$$

La suma de los cuadrados de las diferencias:

$$\Sigma d^2 = 4.14$$

La desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{4.14}{49}} = \sqrt{0.84} \qquad S = 0.29$$

El Intervalo normal o límites de confianza del 95%:

Límites de confianza = $M \pm 2S$ o sea: 0.761 ± 0.29

Límites de confianza = 0.471 - 1.051

Los valores de los Límites de confianza o valores normales que se obtuvieron en los plasmas de personas -- diabéticas, caen dentro de los valores normales calculados para personas no diabéticas, de lo que se deduce que no hay una diferencia significativa entre las dos clases - de determinaciones de lo que podemos decir, que la determinación de AGL en plasma no sirve, en nuestra opinión, como un medio de diagnóstico eficaz para la diabetes, - aun cuando el límite inferior de los valores en plasma de diabéticos resulta bastante más elevado que el inferior - en plasma de personas normales.

La diferencia entre la media aritmética de los valores de la concentración de AGL en plasmas normales y la media aritmética de los valores en plasmas de diabéticos es de 0.071 mEq/l, lo cual, tampoco es un valor - alto que nos indique una diferencia precisa entre las dos - series de datos.

Otro detalle interesante es el hecho de que nuestros resultados son más altos que los reportados previamente por otros autores (Trout 0.45 - 0.90 mEq/l, Duncombe 0.09 - 0.6 mEq/l), para lo cual no hemos encontrado una explicación satisfactoria y pensamos que como trabajo posterior deben incluirse pruebas de recuperación para confirmar nuestros hallazgos y en tal caso queda la posibilidad de que las cifras en México sean más altas - por el tipo de alimentación acostumbrado, o por posible desaprovechamiento parcial de glúcidos de origen racial, u otro factor desconocido.

CAPITULO V

RESUMEN

1.- Revisión breve sobre el metabolismo de Carbohidratos y de Lípidos:

El metabolismo de Carbohidratos y el de lípidos, así como las relaciones existentes entre los dos, están representados principalmente en los ciclos de Embden-Meyerhof, de Krebs y ciclo de la oxidación de los ácidos grasos, en los que queda ilustrado el papel que desempeña la coenzima A como substancia relacionadora de los dos metabolismos de tal manera que, cualquier proceso que interfiera en la incorporación rápida de la acetil - coenzima "A" al ciclo de Krebs como lo es la diabetes - mellitus o la inanición, interferirá también en el metabolismo de lípidos acelerando la oxidación de éstos y por - lo tanto, determinará un aumento en su transporte en -- forma de ácidos grasos libres a través de la circulación - sanguínea, cuando la concentración sanguínea de ácidos grasos aumenta 4 veces o más, ésto es un indicio de -- que las grasas están siendo utilizadas en grandes cantidades por las células, lo que ocurre cuando el cuerpo carece de carbohidratos o no puede utilizar debidamente los - que posee para obtener energía.

Esta situación se presenta regularmente en casos muy avanzados de diabetes y una prueba positiva de cetonuria es un indicio de la degradación anormal de lípidos - en el organismo, por lo tanto consideramos que un estudio interesante sería la determinación de Acidos Grasos - Libres en relación a la presencia de compuestos cetónicos en la orina; sin embargo, es de pensarse que tampoco en esos casos pudiera tener utilidad diagnóstica, ya que es - más práctico determinar los compuestos cetónicos en la — orina que los AGL en plasma.

La formación y oxidación de los ácidos grasos en-

el organismo depende principalmente de la ingestión calórica del individuo, y en segundo término de la actividad hormonal; la hipófisis interviene en la movilización de la grasa de los depósitos hacia el hígado por medio de un factor que algunos autores han denominado "factor de movilización de lípidos" o adipoquinina. El aumento de grasa en el hígado determina, indirectamente, aumento en su degradación y por lo tanto, un aumento en la cetogénesis.

La adenohipófisis, por medio de la hormona de crecimiento modifica indirectamente el metabolismo de lípidos en virtud de su acción diabetogénica, el mecanismo de acción parece residir en la inhibición de la insulina con lo que se produce una disminución en la utilización de carbohidratos con lo que el organismo tiende a consumir grasa.

Los corticoides suprarrenales aumentan la degradación de los ácidos grasos (y con ello aumenta la cetogénesis) y bloquean la síntesis de lípidos a partir de carbohidratos.

La Insulina tiene efecto acelerador de la oxidación de la glucosa, aumenta la cantidad de glucosa convertida en grasa (lipogénesis) e inhibe la cetogénesis.

Los ácidos grasos libres constituyen un factor clave en el mecanismo de transporte de lípidos, están unidos a albúmina y representan el modo de transporte de los depósitos de grasa a los diversos tejidos entre ellos el hígado, para que allí sufran su oxidación final. En estado de ayuno o cualquier situación que implique una demanda de grasas aumentada con fines de oxidación, hay un aumento en la cantidad de AGL plasmáticos, así, en diabéticos que pueden considerarse como sujetos que oxidan las grasas de manera más activa que las personas normales, la concentración de los AGL está aumentada.

2.- Ensayo del método comparando los resultados obtenidos utilizando suero y plasma obtenido con - ehparina y EDTA.

El método de Duncombe, método colorimétrico basado en la reacción de los ácidos grasos con el cobre -- dando una sal soluble en cloroformo y la posterior determinación de su concentración a través de la déterminación del cobre en el cloroformo mediante el dietilditiocarbamato de sodio, fue el método utilizado en este trabajo debido a su sencillez, pues evita la extracción preliminar - de lípidos del plasma, es rápido y no necesita material complicado y costoso como las técnicas de titulación.

Con objeto de determinar las diferencias en los resultados utilizando diferente anticoagulante, se estudiaron 12 casos en los que se tomó suero, plasma con heparina y plasma con EDTA provenientes de las mismas personas y se pudo observar que los resultados obtenidos en plasma con heparina fueron siempre más altos que los resultados en suero y éstos más que los obtenidos en plasma con EDTA, estas variaciones van desde un 7% hasta - un 37% con los valores entre heparina y suero y desde - un 8% hasta un 29% con los valores entre plasma obtenido con EDTA y suero, por lo que las determinaciones posteriores, tanto de valores normales como en diabéticos, - se hicieron utilizando EDTA como anticoagulante, ya que éste en el anticoagulante más comunmente utilizado en - los laboratorios clínicos, es económico y permite la de-- terminación de glucosa y de AGL en la misma muestra.

3.- Determinación de valores normales:

Para determinar los valores normales en México, - se obtuvieron 50 plasmas de personas normales usando -- EDTA como anticoagulante, se realizaron las determina-- ciones de AGL en los 50 casos siempre en las mismas -- condiciones y controlando los resultados por medio de patrones. Se sacó la media aritmética, la desviación están

dar y los límites confiables o permisibles considerando - el 95% de los casos o sea $\pm$ 2S, y los valores resultantes fueron los siguientes:

MEDIA ARITMETICA = 0.69 mEq/l.
DESVIACION ESTANDAR, S = 0.23
INTERVALO NORMAL O VALORES NORMALES: 0.23 a 1.15 mEq/l.

Los valores normales obtenidos difieren de los reportados por la literatura alemana que son de 0.09 a 0.6 mEq/l.

4.- Determinación de valores en personas diabéticas:

Con objeto de observar la variación entre los resultados en personas sanas y diabéticos, se tomaron 50 plasmas de personas diabéticas utilizando EDTA como anticoagulante y siguiendo la misma técnica que para los casos normales. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

MEDIA ARITMETICA = 0.761 mEq/l.
DESVIACION ESTANDAR, S = 0.29
LIMITES DE CONFIANZA CONSIDERANDO $\pm$ 2S = 0.471 - 1.051.

Como se puede observar, los valores obtenidos en plasmas de diabéticos, caen dentro de los límites normales, de lo que deducimos que la determinación de AGL en plasma no es un método de diagnóstico eficaz para la diabetes.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

La técnica expuesta para la determinación de Acidos Grasos Libres en plasma o suero, resulta fácil y de bajo costo, es un método confiable por su precisión y exactitud y se lleva a cabo con la suficiente rapidez como para utilizarlo como método de rutina en laboratorios clínicos.

Los resultados obtenidos en los plasmas normales que fueron: 0.23 - 1.15 mEq/l, nos hacen pensar que en nuestro medio, los valores que podemos considerar normales abarcan un rango bastante más amplio que el reportado por diversos autores como Trout que nos da valores comprendidos entre 0.45 y 0.90 mEq/l, Duncombe que nos da valores entre 0.09 y 0.6 mEq/l.

Los valores obtenidos con plasma de personas diabéticas, no muestran diferencias claras como para utilizar la determinación de AGL como un método de diagnóstico de la diabetes o para seguir el curso del padecimiento, ya que en la mayoría de los casos, los niveles de los AGL caen dentro de los niveles normales y la concentración de AGL no sigue una proporción directa con los niveles de glucosa, ya que en algunos casos en que los niveles de glucosa resultaron muy elevados, los de AGL fueron normales o incluso del límite inferior de los valores obtenidos en plasmas de diabéticos.

Es importante hacer notar la gran variación que nos resulta utilizando diferentes anticoagulantes, por lo que, siempre que se quiera llevar a cabo la determinación de AGL en plasma o suero, debe tomarse en cuenta el tipo de anticoagulante utilizado, pues ésto es un factor de error importante así como la pureza de los reactivos y la limpieza del material.

BIBLIOGRAFIA

Arthur C. Guyton.
Tratado de Fisiología México.
4a. Ed.
Edit. Interamericana. 1971

Cantarow, Schepartz.
Bioquímica.
3a. Ed.
Edit. Interamericana. 1964

Eric E. Conn y P.K. Stumpf.
Principios de Bioquímica.
2a. Ed.
Edit. Limusa-Wiley, S.A. 1969

José Laguna.
Bioquímica.
1a. Reimpresión.
Prensa Médica Mexicana. 1960

P.J.N. Howorth, S. Gibbard & Vincent Marks.
Clin. Chim. Acta.
14 (1966) 69.

Tietz.
Química Clínica Moderna.
1a. Ed.
Ed. Interamericana. 1972

Vincent P. Dole.
J. Clin. Invest., 35 (1956) 150.

W.G. Duncombe, Biochem. J., 88 (1963) 7.

W.G. Duncombe, Clin. Chim. Acta., 9 (1964) 122.