

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



GLUCIDOS: SU METABOLISMO Y FISIOPATOLOGIA,
ALTERACIONES; TEMA DEL PROGRAMA DE ANALISIS
BIOQUIMICO CLINICOS.

TESIS PROFESIONAL

Que Para Obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P r e s e n t a

FRANCISCO MOLINA ZAMUDIO

México, D. F.

1978



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.

TESIS 1978
M.C. 289 288
FECHA _____
PROC. _____



A mis padres :

*Por el gran apoyo que me dieron
para lograr esta meta.*

A mi esposa e hijas :

*Por el amor y paciencia que
me han tenido.*

A mis hermanos :

Por enseñarme el camino.

*A mi asesora Dea Coronado P. :
Por su valiosa ayuda que me brindó
tan desinteresadamente.*

*A mis maestros :
Por la aportación de sus conocimientos.*

*A mis compañeros y amigos :
Por los momentos de alegría
que me han brindado.*

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TITULO DEL TEMA:

"GLUCIDOS: SU METABOLISMO Y FISIOPATOLOGIA,
ALTERACIONES; TEMA DEL PROGRAMA DE ANALISIS
BIOQUIMICO CLINICOS".

NOMBRE DEL SUSTENTANTE:

FRANCISCO MOLINA ZAMUDIO

CARRERA:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

AÑO:

1978.

Jurado asignado originalmente según el tema.

PRESIDENTE PROF. DEA CORONADO PERDOMO

VOCAL PROF. MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO

SECRETARIO PROF. JOSEFINA PIEDRAS ROSS

1er. SUPLENTE PROF. LETICIA CARRASCO RIVERA

2do. SUPLENTE PROF. ESTHER GUTIERREZ HIDALGO

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 301 de la Facultad de Química

Nombre completo y firma de sustentante: FRANCISCO MOLINA ZANUDIO

Nombre completo y firma del asesor del tema: Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO

INTRODUCCION.

Los glúcidos son de gran importancia clínica, se encuentran alterados en casos patológicos que cursan con alteración metabólica como la diabetes mellitus y su determinación ayuda al diagnóstico.

Para descubrir casos de diabetes es necesario realizar un estudio de la glucosa sanguínea ya que esta se encuentra elevada en dicho padecimiento.

Existen diferentes métodos de cuantificación tales como las pruebas de tolerancia a la glucosa (oral e intravenosa) y la determinación de glucosa en líquidos orgánicos, los cuales son de gran utilidad para el diagnóstico y control del padecimiento.

La cuantificación de glucosa se practica en los análisis de rutina, cuando existen sospechas de diabetes en algún paciente y para el control de la terapéutica.

Las personas más susceptibles de padecer la diabetes mellitus son aquellas que tienen antecedentes hereditarios diabéticos, sobrepeso, hiperlipemia, infecciones -- frecuentes, cansancio inespecífico, hiperglucemia postprandial, glucosuria, etc.

En el presente estudio se hizo una revisión sobre el metabolismo, fisiología normal, sus alteraciones y la analítica clínica de los principales glúcidos de los fluidos orgánicos. Así como la interpretación de los resultados obtenidos por los diferentes métodos.

Con el objetivo de : Explicar las principales alteraciones metabólicas de los glúcidos en el organismo humano, desde el punto de vista químico, sus causas, métodos químicos de identificación, cuantificación e interpretación de los resultados.

C A P I T U L O I .

G E N E R A L I D A D E S

FISIOLÓGIA DE LOS GLÚCIDOS.

A) FUENTES.

1) Exógenas.

La digestión de la mayor parte de los glúcidos de la dieta, tales como almidón, sacarosa y lactosa, producen los monosacáridos glucosa, fructosa y galactosa, los cuales pasan al torrente sanguíneo.

Si la lactosa y sacarosa son absorbidas o entran a la sangre por inyección, — ellas son tratadas como sustancias extrañas y excretadas en la orina, puesto que no existen las enzimas necesarias para su hidrólisis en monosacáridos aprovechables.

2) Endógenas.

De varios compuestos glucogénicos por medio de la gluconeogénesis. Estos compuestos caen en dos categorías: aquellos que implican una conversión neta directa en glucosa sin reciclización importante, tales como algunos aminoácidos; y aquellos que son los productos del metabolismo parcial de la glucosa en ciertos tejidos y que son llevados al hígado y riñones, donde son resintetizados en glucosa. De esta manera, el lactato, formado por la oxidación de la glucosa en el músculo esquelético y en los — eritrocitos, es transportado al hígado y los riñones donde vuelve a formar glucosa, — la cual queda nuevamente disponible por vía circulatoria para la oxidación en los tejidos. Este proceso se conoce como el ciclo de Cori o ciclo del ácido láctico.

Del glucógeno hepático por glucogenólisis.

B) DIGESTION.

1) Bucal.

La saliva es realmente poco importante en la digestión. Contiene una enzima, la ptialina que es una amilasa salival que desintegra las moléculas de almidón. Sin embargo, esta enzima es fácilmente inactivada a un pH de 4.0 o menor, de manera que la acción digestiva sobre los alimentos en la boca, cesa pronto en el medio ácido del es tómago.

2) Estomacal.

Las enzimas amilolíticas no están presentes en el jugo gástrico. Los únicos efectos sobre el almidón durante su paso a través del estómago son aquellos de posible actividad residual y quizá alguna hidrólisis catalizada por iones hidrógeno.

3) Intestinal.

La mejor localización para la digestión del almidón y el glucógeno es el intestino delgado, y la enzima más importante involucrada en este proceso es la amilasa — pancreática.

La alfa-amilasa puede efectuar la digestión del gránulo de almidón intacto y no requiere ruptura preliminar de él. Por lo tanto, los gránulos de almidón indigeribles son poco frecuentes en las heces de individuos sanos en dietas normales, pero pueden ocurrir abundantemente en las heces cuando la amilasa pancreática no entra en la luz intestinal en una proporción normal.

CIABSORCIÓN.

Los productos de la digestión de los glúcidos se absorben en el intestino y pasan a la sangre del sistema porta en la forma de monosacáridos, especialmente hexosas (glucosa, fructosa, manosa y galactosa) aunque también son absorbidas las pentosas si existen en el alimento ingerido. Los oligosacáridos y los disacáridos son hidrolizados por enzimas apropiadas provenientes de las superficies mucosas del intestino delgado. Los monosacáridos derivados de estas reacciones hidrolíticas son absorbidos entonces por las células epiteliales del yeyuno. Hay dos mecanismos específicos para la absorción de estos azúcares; la glucosa y la galactosa, cuyas estructuras químicas — son idénticas excepto por la orientación de los grupos H y OH del carbono 4, son transportadas activamente contra sus propios gradientes de concentración. Este proceso de transporte activo requiere de Na^+ . La fructosa es absorbida más lentamente que la — glucosa y la galactosa. Su absorción parece proceder gracias a un sistema específico de difusión facilitada diferente del mecanismo de transporte activo, dependiente de — la energía, para la glucosa y la galactosa.

La hidrólisis de los polisacáridos y oligosacáridos es un proceso rápido; por lo tanto, los mecanismos de absorción para la glucosa-galactosa y fructosa se saturan con rapidez.

D) REGULACION DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN SANGRE.

La regulación de la concentración de la glucosa sanguínea es, de todos los mecanismos homeostáticos, uno de los más finamente regulados y en el cual toman parte el hígado, los tejidos extrahepáticos y varias hormonas. Las células hepáticas parecen ser libremente permeables a la glucosa, mientras que las células de los tejidos extra hepáticos son relativamente impermeables. Esto da por resultado que la membrana celular sea el paso limitante de la tasa de incorporación de glucosa en los tejidos extra hepáticos, mientras que es probable que la actividad de ciertas enzimas y la concentración de ciertos intermediarios claves, ejerzan un efecto mucho más directo sobre —

la incorporación o salida de glucosa en el hígado. Sin embargo, la concentración de la glucosa en la sangre es un parámetro importante para determinar la velocidad en que — tanto el hígado como los tejidos extrahepáticos toman la glucosa. Se debe advertir que la hexocinasa es inhibida por la glucosa-6-fosfato, de manera que se pueda ejercer algún control por retroalimentación sobre la captación de glucosa en los tejidos extrahepáticos dependiendo de la hexocinasa para la fosforilación de la glucosa. El hígado no está sometido a esta coacción ya que la glucocinasa no es afectada por la glucosa-6-fosfato.

A concentraciones normales de glucosa sanguínea (80 a 100 mg/dl), el hígado parece ser el productor neto de glucosa. Sin embargo, cuando se eleva el nivel, cesa la salida de la misma y a niveles altos hay incorporación neta, mientras que una caída en la glucosa sanguínea da como resultado un aumento en la liberación de glucosa por el hígado.

Mucha de la información en cuanto al papel del hígado en el mantenimiento de la glucosa sanguínea ha sido obtenida en perros y otros animales hepatectomizados. La glucosa sanguínea de tales animales cae rápidamente a niveles hipoglucémicos que producen convulsiones y muerte, a menos que les sea administrada glucosa intravenosamente.

El animal sin hígado no puede formar cantidades apreciables de glucosa a partir de sustancias no glúcidas, tales como ácido láctico y aminoácidos, los cuales son rápidamente convertidos a glucosa por el animal normal.

El glucógeno muscular no puede servir directamente como una fuente de glucosa — sanguínea puesto que los experimentos con perros hepatectomizados han demostrado que se encontraron cantidades apreciables de glucógeno en los músculos de estos animales — cuando el nivel de glucosa sanguínea había caído muy abajo. Soskin demostró que el glucógeno muscular de los animales sin hígado no es convertido a glucosa sanguínea cuando se les somete a los efectos de la epinefrina, anestesia con éter y asfixia. Estos procedimientos causan hiperglucemia solamente cuando el hígado está presente y contiene glucógeno. El glucógeno muscular puede formar glucosa sanguínea solamente cuando este es degradado a ácido láctico, el cual es transportado al hígado por la sangre, en donde es convertido a glucosa.

Landau y col. (1961) han demostrado que en los perros, el nivel del azúcar sanguíneo en el cual hay una incorporación neta por el hígado, varía con el tipo de la — dieta. Así, la infusión de glucosa en perros mantenidos con una dieta alta en proteínas, da por resultado un aumento en la glucosa sanguínea, con un cese de la producción neta de la glucosa hepática sólo a niveles hiperglucémicos. En contraste, en los perros alimentados con glúcidos, la glucosa sanguínea aumenta muy poco en concentración después de la infusión de glucosa y hay una incorporación neta inmediata de ella en el —

hígado. Una explicación de estas diferencias, debidas a cambios en las dietas, se puede encontrar probablemente, en los cambios en la actividad de la enzimas hepáticas — encargadas de la glucólisis y la gluconeogénesis.

El principal producto de la digestión de los carbohidratos y el principal glúcido circulante es la glucosa. Una vez que ésta penetra en las células es normalmente — fosforilada para formar glucosa-6-fosfato. La enzima que cataliza esta reacción es la hexocinasa. En el hígado, existe además una enzima llamada glucocinasa que tiene mayor especificidad para la glucosa y la cual, a diferencia de la hexocinasa, es incrementada por la insulina y está disminuida en la inanición y en la diabetes.

La demolición de la glucosa hasta CO_2 y agua se llama glucólisis.

El catabolismo de la glucosa procede por dos rutas: por el desdoblamiento en — triosas o por la oxidación y descarboxilación a pentosas. La ruta del ácido pirúvico a través de las triosas es la vía de Embden-Meyerhof y la ruta a través del ácido glu — cónico y de las pentosas es la vía oxidativa directa o derivación de la hexosamonofo — sfato. El ácido pirúvico es convertido en acetil-CoA.

La glucosa-6-fosfato es polimerizada en glucógeno y este proceso se llama gluco — génesis y a la demolición del mismo glucogénólisis.

El glucógeno es la forma de reserva de la glucosa, se encuentra en la mayoría — de los tejidos del organismo, pero las principales existencias son las del hígado y — de los músculos esqueléticos.

Las interconversiones de los glúcidos, proteínas y grasas incluyen la conversión del glicerol de las grasas en fosfato de dihidroxiacetona y la de cierto número de a — minoácidos, con esqueletos de carbono semejantes a los intermediarios de la vía de — Embden-Meyerhof y del ciclo del ácido cítrico. De esta manera, las moléculas distin — tas a la glucosa pueden ser convertidas en ella. Este proceso es conocido como gluco — neogénesis. La glucosa puede ser convertida en grasas a través de la acetil-CoA, pero como la conversión del ácido pirúvico en acetil-CoA, a diferencia de la mayoría de — las reacciones de la glucólisis, es irreversible, las grasas no son convertidas en — glucosa por esta vía. Por lo tanto, ocurre muy poca conversión neta de grasas en glú — cidos en el organismo, porque, excepto para la producción sin importancia cuantitati — va del glicerol, no existe ruta para la conversión.

Además de los efectos directos de la hiperglucemia que refuerzan la incorpora — ción de glucosa tanto en el hígado como en los tejidos periféricos, la hormona insul — na juega un papel central en la regulación de la concentración de la glucosa sangui — nea.

INSULINA: ESTRUCTURA, SÍNTESIS Y LIBERACIÓN.

La insulina, es la hormona antidiabética que se produce en el páncreas por las células beta de los islotes de Langerhans, es una proteína que está formada por 51 aminoácidos, tiene un peso molecular mínimo de 6,000 y es estable en soluciones diluidas a pH de 2.5 a 3.5 .

La molécula de insulina está compuesta de dos cadenas de polipéptidos, designadas A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos) que están conectadas entre sí por dos enlaces disulfuro que unen los aminoácidos cistina. La cadena contiene además un enlace disulfuro entre dos de sus cistinas que es importante porque la secuencia de aminoácidos dentro de él, es diferente, para las distintas especies animales. La insulina de cerdo, de perro y la humana tienen una composición de aminoácidos similar en estas posiciones y difieren entre sí únicamente en el carboxilo terminal de la cadena B. La insulina de cerdo en forma similar a la bovina, tiene alanina en esta posición; la insulina humana tiene en cambio treonina.

La síntesis de la insulina biológicamente activa que se puede medir en sangre es el resultado final de una serie de pasos. En primer lugar se forma proinsulina, - esta es una cadena de polipéptidos larga con un peso molecular de cerca de 9,000 .

En segundo lugar hay un rompimiento de la cadena de proinsulina que queda dividida en insulina y una cadena conocida con el nombre de péptido conectante.

Cuando la biosíntesis de insulina se sigue en una célula beta pancreática, se puede observar que la proinsulina se localiza en el retículo endoplásmico.

A partir de aquí la proinsulina se convierte a insulina en el aparato de Golgi, finalmente se almacena en los gránulos. Estos gránulos de la célula beta están compuestos de cristales de zinc de insulina.

Las tres posibles formas más aceptadas de secreción de insulina son :

1. Liberación microvesicular.
2. Liberación por emiocitosis.
3. Liberación intracitoplásmica de un contenido granular previamente modificado, mecanismo que puede incluir la liberación del contenido granular dentro del citoplasma.

FUNCIONAMIENTO DE LA INSULINA.

1. Niveles de insulina elevados = el estado de "alimentación".

Niveles de insulina bajos = el estado de "ayuno".

El hombre normal oscila entre los estados de alimentación y ayuno mientras se alimenta por comidas separadas. La rápida metabolización de la ingesta durante el estado de alimentación es el resultado de un aumento en la concentración de insulina. La movilización de los principios energéticos desde los depósitos durante los períodos entre comidas es función de una concentración baja de insulina.

2. Efectos metabólicos de la insulina.

La insulina reacciona con la membrana de ciertas células para disparar un "segundo" mensajero o señal.

Modificaciones de membrana— permeabilidad a la glucosa.

transporte de aminoácidos.

flujo de potasio.

Modificaciones intracelulares— aumentos y disminuciones de enzimas.

3. Tejido adiposo — captación de glucosa.

síntesis de lípidos (combustible más económico).

captación de triglicéridos (lipoproteínas).

reducción de la lipólisis.

4. Tejido muscular — captación de glucosa — síntesis de glucógeno

metabolismo de glucosa

captación de aminoácidos.

síntesis proteica.

reducción de la lipólisis.

5. Hígado.

Insulina alta

Captación de glucosa

Depósito de glucógeno

Metabolismo de la glucosa

Síntesis lipídica

Insulina baja

Liberación de glucosa

Glucogenólisis

Gluconeogénesis

Oxidación lipídica a cetocácidos.

6. Insulina alta — el estado de "alimentación".

Músculo — oxidación de glucosa

síntesis proteica

Adiposo — captación de glucosa y síntesis lipídica
captación de triglicéridos

no lipólisis intracelular, no movilización lipídica

Hígado — captación de glucosa, síntesis de glucógeno y lípidos.

7. *Insulina baja* — el estado de "ayuno" — estrechamente controlado por la insulina.

Músculo — no captación de glucosa, utiliza ácidos grasos y cetoácidos.

Adiposo — no captación de glucosa, libera ácidos grasos libres.

Hígado — gluconeogénesis para proveer de glucosa al cerebro, cetoagénesis-cetoácidos metabolizados por el músculo.

El glucagón es la hormona producida por las células alfa de los islotes de Langerhans del páncreas. Su secreción es estimulada por la hipoglucemia y, cuando llega al hígado causa la glucogenólisis al activar a la fosforilasa de una manera similar a la epinefrina. La mayor parte del glucagón endógeno es excluida de la circulación por el hígado. A diferencia de la epinefrina, el glucagón no tiene acción sobre la fosforilasa del músculo. El glucagón aumenta también la gluconeogénesis a partir de los aminoácidos y el ácido láctico.

La epinefrina cuando es secretada por la médula adrenal, estimula la demolición del glucógeno muscular. Sin embargo, la administración de epinefrina lleva a un derrame de glucosa desde el hígado, siempre y cuando esté presente el glucógeno. En el músculo, como resultado de la ausencia de glucosa-6-fosfatasa, la glucólisis sucede con la formación de lactato. El lactato, que difunde a la sangre, es convertido por los mecanismos gluconeogénicos, de vuelta a glucógeno en el hígado. La estimulación de la glucogenólisis por la epinefrina se debe a su capacidad para activar a la enzima fosforilasa. La hipoglucemia causa una descarga simpática. La secreción aumentada de epinefrina estimula la glucogenólisis, la cual es seguida por una elevación en el nivel de la glucosa sanguínea.

La pituitaria anterior secreta hormonas que tienden a elevar el azúcar sanguíneo y, por lo tanto, antagonizan la acción de la insulina. Estas son: La hormona de crecimiento, ACTH (corticotropina) y posiblemente otros principios diabéticos. La secreción de la hormona de crecimiento es estimulada por la hipoglucemia. Esta hormona disminuye el consumo de glucosa en ciertos tejidos como el músculo. Algo de este efecto puede no ser directo, ya que moviliza los ácidos grasos libres del tejido adiposo, los cuales, por sí mismos, inhiben la utilización de la glucosa. La administración crónica de hormona de crecimiento conduce a la diabetes. Al producir hiperglucemia, estimula la secreción de insulina, causando finalmente el agotamiento de las células beta. Aunque la ACTH pudiera ejercer un efecto indirecto en la utilización de la glucosa, ya que refuerza

-za la liberación de los ácidos grasos libres del tejido adiposo, su efecto principal en el metabolismo de los glúcidos se debe a la estimulación de la secreción de las hormonas de la corteza adrenal.

La corteza adrenal secreta cierto número de hormonas esteroides, de las cuales los glucocorticoides (11-oxiesteroides) son importantes en el metabolismo de los glúcidos. La administración de estos glucocorticoides estimula la gluconeogénesis. Esto es como resultado del aumento del catabolismo protéico en los tejidos, elevación del consumo hepático de aminoácidos e incremento de la actividad de las transaminasas y otras enzimas involucradas con la gluconeogénesis en el hígado. Además, los glucocorticoides inhiben la utilización de la glucosa en los tejidos extrahepáticos. En todas estas acciones, los glucocorticoides actúan de una manera antagónica a la insulina.

La hormona tiroidea debe también ser considerada porque afecta el azúcar sanguíneo. Existe la evidencia experimental de que la tirosina tiene una acción diabética y de que la tiroidectomía inhibe el desarrollo de la diabetes. Se ha notado también que hay una completa falta de glucógeno en los hígados de animales con tirotoxicosis. En las personas, el azúcar sanguíneo en ayunas está elevado en los enfermos hipertiroideos y disminuido en los hipotiroideos. No obstante, los enfermos hipertiroideos aparentemente utilizan la glucosa a una tasa normal mientras que los enfermos hipotiroideos tienen disminuida su capacidad para utilizar la glucosa. Además, estos últimos son mucho menos sensibles a la insulina que los sujetos normales o hipertiroideos. Todos estos efectos de la hormona tiroidea sobre el metabolismo de los glúcidos pueden ser relacionados con las diferencias en las respuestas de los órganos terminales, con las tasas de destrucción de la insulina o con ambos factores.

C A P I T U L O 2.

T R A S T O R N O S D E L
M E T A B O L I S M O D E
L O S G L U C I D O S.

FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES.

- A. Problema básico — disminución absoluta o relativa de insulina "muy poco y/o muy tarde".
- B. Deficiencia moderada de insulina.
- Captación inadecuada de glucosa en músculo, tejido adiposo, hígado.
 - Por lo tanto hiperglucemia sostenida (intolerancia a la glucosa).
 - Captación inadecuada de triglicéridos en el tejido adiposo (hipertriglicéridemia).
 - Mayor síntesis de triglicéridos en el hígado (hiperlipemia endógena).
 - Tejidos insulino independientes expuestos a un medio más rico en glucosa — y grasa, que probablemente predisponen a enfermedad micro y macro vascular.
- C. Deficiencia severa de insulina.
- Captación de glucosa ausente en músculo, tejido adiposo e hígado.
 - Excesiva destrucción de proteína muscular a aminoácidos.
Excesiva destrucción de tejido adiposo a ácidos grasos.
Excesiva producción hepática de glucosa.
Excesiva producción hepática de ácidos cetónicos.
 - Hiperglucemia, cetoacidosis, muerte.
- D. Algunas aplicaciones clínicas.
- Obesidad: causa resistencia de los tejidos a la acción de la insulina.
Por lo tanto, se requieren niveles de insulina más altos. Si las células-beta son defectuosas, la obesidad desmascara la diabetes. En tanto que, — la pérdida de tejido adiposo disminuye la deficiencia relativa de insulina.
 - En caso de deficiencia moderada de insulina, pequeñas cantidades de glucosa producidas endógenamente por el hígado, o exógenamente a partir de comidas o infusiones, permanecen en la circulación produciendo polidipsia, poliuria, colapso del volumen circulatorio, y eventualmente coma hiperosmolar.
 - La hipoglucemia puede ser de comienzo muy rápido (minutos), la cetoacidosis toma cuando menos (en el adulto) 24 a 48 horas de deficiencia de insulina.

d) En la deficiencia severa de insulina el grado de cetoacidosis correlaciona con la proporción con que el tejido produce glucosa.

E. Nuevos conceptos de complicaciones.

a) Niveles altos de glucosa en algunas células (de las paredes vasculares, células de Schwann de los nervios, etc.), causan acumulación de sorbitol, — una molécula de glucosa "reducida" y ésta a su vez daña los tejidos.

b) Niveles altos de glucosa (o falta de insulina) pueden causar en algunas células síntesis de complejos moleculares largos que contienen azúcares derivados de la glucosa y proteínas similares al colágeno, que pueden dar lugar a engrosamiento y alteración de la permeabilidad de ciertas membranas, tales como la membrana basal glomerular del riñón o la membrana basal vascular de los vasos de la retina.

c) Hiperlipidemia: resulta de una alteración en la captación de grasa por el tejido adiposo, grasa que se deriva de la dieta o que es producida en forma endógena, lo que puede hacerse en exceso. Todo ello lleva a una predisposición aumentada a la aterosclerosis.

Clasificación y estados de la diabetes.

Durante los últimos 20 años se ha hecho aparente para los investigadores en el campo de la diabetes que la hiperglucemia o aún la moderada pero significativa anomalía de la curva de tolerancia a la glucosa es un evento tardío en el desarrollo del estado diabético.

La opinión de Nairn con respecto a la naturaleza hereditaria de la diabetes — ha sido ampliamente corroborada. El cambio genético en sí por supuesto es aún totalmente desconocido, pero es claro que un individuo con diabetes tiene uno o más genes alterados. De acuerdo a ello la diabetes es una "enfermedad molecular" o sea un padecimiento en el cual "componentes" celulares importantes están ausentes, seriamente dañados o perdidos. Eventualmente, las actividades de estas substancias o de sus productos encuentran su expresión en diferentes formas culminando en el criterio clásico de diabetes franca.

Aún sin conocerse el material hereditario que el diabético recibe, se puede — tratar de controlar el efecto que este material tiene en él, durante el período en el cual existe una anomalía latente. Este período que va del momento de la concepción al de la primera tolerancia anormal a la glucosa es llamado el período prediabético de diabetes.

Prediabetes significa antes de diabetes, y puede ser arbitrariamente definida como la condición de aquellas personas que eventualmente desarrollan diabetes, pero en

Los cuales ninguna anomalía del metabolismo de los glúcidos es demostrable en una prueba de tolerancia a la glucosa (oral o intravenosa) aún después de la administración de esteroides. Esta resistencia dinámica de la diabetes, no siempre exitosa se caracteriza lo que ha sido llamado el período prediabético.

Obviamente este período de prediabetes precede el estado de diabetes "química" en el cual no hay síntomas del padecimiento, la glucemia en ayunas es normal, pero - la tolerancia a la glucosa está alterada (con o sin la adición de esteroides, embarazo, infección, estrés, etc.). Este estado de diabetes química señala "el fin de la batalla para resistir el desarrollo de la diabetes" y es el momento más temprano en que se puede demostrar una tolerancia anormal para la glucosa.

El estado final es el de diabetes clínica franca o sintomática "aguda o crónica" en el cual, hay síntomas característicos del padecimiento y los valores de glucosa son anormalmente altos.

Estos 3 estados, desde prediabetes hasta diabetes sintomática, no son necesariamente progresivos en dirección de avance, ya que algunos individuos pueden tener regresión de un período a otro (por ejemplo de diabetes química a prediabetes) y - esto puede suceder sin cambios en el peso corporal o en ausencia de tratamiento. Este tipo de regresiones del padecimiento, particularmente de la forma franca, se han documentado por años; y también se ha logrado producirlo en experimentación en animales.

Individuos susceptibles.

Solo en muy pocas ocasiones puede uno estar razonablemente seguro que el estado prediabético existe en presencia de una tolerancia normal para la glucosa. Algunas de estas son las siguientes:

- A. El gemelo idéntico no diabético de un diabético.
- B. Individuos con parientes cercanos diabéticos. De acuerdo a Steinberg, la probabilidad de que una persona tenga una tendencia genética a diabetes es de aproximadamente 100% cuando su padre y su madre son diabéticos; 50 a -- 80% cuando el sujeto tiene un padre diabético y un abuelo por el lado del padre no diabético o con un padre diabético, un hermano diabético y un abuelo diabético del lado del padre que no es diabético; 30 a 40% cuando - los parientes diabéticos son dos abuelos (no esposos entre sí) o cuando un padre y un primo hermano por el lado del padre no diabético tienen este padecimiento.
- C. Mujeres con historia obstétrica anormal.

1. Con productos macrosómicos (más de 4 Kg de peso). No todas las madres - que en el futuro van a ser diabéticas tienen hijos macrosómicos, aunque hayan tenido muchos hijos, Jackson, ha demostrado que el 62% de las madres en su etapa prediabética han tenido cuando menos un niño con más - de 4 Kg de peso en el momento de nacer.
 2. Mortalidad perinatal.
 3. Abortos repetidos.
 4. Toxemia.
 5. Algunas otras alteraciones obstétricas asociadas a prediabetes han sido más discutidas tales como: Infertilidad, hidromnios, prematurez, malformaciones congénitas y lactancia excesiva.
- D. Individuos obesos.
- Karam y colaboradores encontraron una respuesta de insulina a la glucosa, e levada en sujetos obesos. Resultados similares fueron reportados en hijos - de ambos padres diabéticos por Camerini Devalos y colaboradores con una téc nica diferente.
- E. Sujetos con manifestaciones vasculares de las que se observan en la diabe- tes. Estas pueden incluir retinopatía, nefropatía, enfermedad coronaria, etc. y/o alteraciones neurológicas del tipo de la diabetes tales como dolor en - las extremidades e impotencia.

El diagnóstico de la diabetes.

¿Quiénes tendrán diabetes? Casi todos, aunque la mayoría de los casos serán en - mayores de 40 años.

Mayor frecuencia de diabetes.

Antecedentes diabéticos	Infecciones frecuentes
Sobrepeso	Hiper glucemia postprandial
Productos grandes (madres)	Glucosuria (no en ayunas)
Hiperlipemia	Cansancio inespecífico.

Criterio de la O.M.S.

Glucemia "verdadera" (Somogyi-Nelson) mayor de 140 mg/dl 2 horas después de su - ministrar glucosa.

Criterios de la Clínica Joslin.

Todos los valores en mg/dl, glucosa "verdadera", (usando sangre entera)

	Ayunas	1 hora	2 horas	3 horas
Capilar	110	200	150	110
Venosa	110	160	130	110

Regla general : Diabetes posible (búsqueda) : 130 mg/dl 1 o más horas post-glucosa.

Diabetes probable (diagnóstico) : 160 mg/dl 1 o más horas postglucosa.

Existen otros intentos de identificación más precoz de la diabetes. Por el momento deben considerarse en etapa de investigación. Por ejemplo: valoración de insulina inmunoreactiva durante la PTG (valores bajos en futuros diabéticos). Engrosamiento de la membrana basal capilar en la biopsia de músculos (Siperstein). El objetivo de la detección precoz es la posible profilaxis de la progresión, la detención o la prevención definitiva de las anomalías características de la diabetes.

Al tratar de detectar la existencia de diabetes se deben buscar evidencias de (a) insulina insuficiente y (b) insulina retrasada.

En la detección: no se debe confundir la búsqueda del diabético potencial con el diagnóstico del diabético.

Para la búsqueda empleamos el criterio de mayor sensibilidad, mientras que para el diagnóstico los criterios deben tener la mayor especificidad. En general, la glucemia una hora después de dar glucosa es lo más sensible, mientras que su valor a las 2 horas es más específico.

Tesaurosis de glucógeno.

La expresión tesaurosis de glucógeno es genérica e intenta describir un grupo de padecimientos hereditarios caracterizados por el depósito de un tipo o cantidad anormal de glucógeno en los tejidos.

En la glucogenosis de tipo I (enfermedad de Von Gierke), tanto las células hepáticas como las renales de los túbulos contorneados están característicamente cargadas de glucógeno. Sin embargo, estos depósitos de glucógeno parecen ser metabólicamente inaccesibles, como lo evidencia la presencia de hipoglucemia y la falta de glucogenólisis bajo el estímulo de la epinefrina o del glucagón. En estos pacientes también se encuentran cetosis e hiperlipemia, como sería característico de un organismo privado de glúcidos. En los tejidos hepático, renal e intestinal la actividad de la glucosa-6-fosfatasa es extremadamente baja o falta por completo.

Otros tipos de tesaurosis de glucógeno incluyen los siguientes: el tipo II (enfermedad de Pompe), que se caracteriza por una deficiencia de alfa-1,4-glucosidasa (maltasa ácida) lisosómica, cuya función es degradar al glucógeno, el cual, de otra manera, se acumula en los lisosomas; el tipo III (dextrinosis límite) caracterizado por la falta de enzima desramificante, lo que hace que se acumule un polisacárido del tipo de la dextrina límite; y el tipo IV (amilopectinosis) que se caracteriza por la falta de enzima ramificante, con el resultado de que se acumula un polisacárido que tiene pocos puntos de ramificación.

La falta de fosforilasa muscular (miofosforilasa) es la causa de la glucogenosis de tipo V (glucogenosis por deficiencia de miofosforilasa; síndrome de McArdle). Los pacientes de esta enfermedad manifiestan una tolerancia marcadamente disminuida al ejercicio. Aunque sus músculos esqueléticos tienen un contenido anormalmente alto de glucógeno (2.5-4.1%), poco o nada de lactato es demostrable en su sangre después del ejercicio. Sin embargo, se presenta una elevación de la glucemia después de administrar glucagón o epinefrina, lo cual indica que la actividad de la fosforilasa hepática es normal.

Entre las tesaurosis de glucógeno también se describen la glucogenosis de tipo VI que implica una deficiencia de fosfoglucomutasa en el hígado; y el tipo VII caracterizado por una deficiencia de fosfofructocinasa en los músculos.

Glúcidos en orina.

Glucosuria.

La glucosuria ocurre cuando la glucosa sanguínea está elevada debido a la deficiencia relativa de insulina (diabetes mellitus) o por glucogenólisis excesiva después de traumatismos físicos o emocionales.

Normalmente no se excreta más de 1 g de azúcar al día. Cuando existe mayor cantidad se dice que hay glucosuria. Las emociones fuertes tales como las pruebas atléticas reñidas pueden producir glucosuria pasajera. Aproximadamente el 15% de los casos de glucosuria no se deben a diabetes.

En algunos individuos, el mecanismo de transporte de glucosa en los túbulos renales es congénitamente defectuoso, de manera que se presenta glucosuria a niveles normales de glucosa. Este padecimiento se llama glucosuria renal. Se dice que la glucosuria alimentaria, aquella que se presenta después de la ingestión de una comida rica en glúcidos, ha sido encontrada en individuos normales, pero en realidad muchos de ellos padecen diabetes mellitus ligera.

Fructosuria.

La fructosuria es una anomalía rara en la cual está alterado el metabolismo de la fructosa pero no es de otros glúcidos.

Galactosuria y lactosuria.

En ocasiones puede presentarse galactosuria y lactosuria en los recién nacidos y en la madre durante el embarazo, la lactancia y el período de destete. En la galactosemia congénita, que es una enfermedad hereditaria caracterizada por incapacidad de convertir la galactosa en glucosa, los niveles de galactosa sanguínea están muy elevados y la galactosa se excreta con la orina.

C A P I T U L O 3.

M E T O D O L O G I A

PRUEBAS DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.

La importancia del metabolismo de la glucosa en la fisiología y patología humana ha obligado, desde hace muchos años, a buscar y establecer métodos analíticos, que informen con la mayor exactitud posible sobre la dinámica de este proceso fundamental; — no obstante, este objetivo permanece en controversia hasta el momento.

La diabetes mellitus, padecimiento crónico, incurable, altamente incapacitante, — de control privado o institucional costosos y prevalencia creciente, es la enfermedad que requiere contar con mayor urgencia con los procedimientos rápidos, fáciles y precisos, para su detección y tratamiento consecutivo.

Antecedentes.

Cabe recordar algunos de los hechos más sobresalientes que ejemplifican el esfuerzo de la humanidad, para conocer la fenomenología de este proceso:

Mattahaeus Dobson en Inglaterra (1745—1784), demostró químicamente la presencia de azúcar en la orina de los diabéticos.

En 1811, W.H.W. Wallaston propuso un método cromatográfico (desgraciadamente poco sensible) para determinaciones de azúcar en la sangre del diabético.

Cuatro años más tarde en Francia, M. Chevreul, identifica como glucosa el azúcar de la orina de los diabéticos.

Casi un siglo después (1909), la ineficacia de los métodos analíticos de la época, impidieron que G. Zuelzer prosiguiera sus estudios con extractos pancreáticos activos, que causaron algunas muertes por hipoglucemia y, consecuentemente, se retardó el descubrimiento de la insulina.

Folin y Wu en 1920, publicaron un método satisfactorio para la determinación de glucosa sanguínea, que culminó en el año 1921, con el descubrimiento de la insulina — por Banting y Best en la Universidad de Toronto. A partir de entonces han aparecido numerosos métodos de laboratorio, cada vez más sensibles y específicos para la cuantificación de "glucosa verdadera", como son, entre otros, el de Somogyi modificado por Nelson y el de la o-toluidina.

Los procesos señalados permiten la estimación de los niveles de glucosa circulante en un momento dado; pero no informan sobre las variaciones derivadas del aprovechamiento orgánico de la glucosa, consecutivas a la ingesta de alimentos, a una carga — oral o endovenosa de glucosa, o como resultado de los mecanismos homeostáticos de regulación de la glucemia durante el ayuno.

Estos fenómenos dinámicos sólo pueden conocerse por muestreos sucesivos, en lapsos predeterminados y bajo condiciones específicas.

Esta concepción dinámica de apreciación ha dado lugar al estudio del "metabolismo de la glucosa en su etapa circulante" y al establecimiento de diferentes esquemas - de pruebas llamadas genéricamente de tolerancia a la glucosa.

Actualmente los procedimientos científicos exigen una metodología establecida - perfectamente y un cálculo estadístico final que aclare matemáticamente su nivel de exactitud y reproductibilidad; pero es bien sabido que mientras mayor sea el número de "factores variables" en los métodos propuestos, la obtención de condiciones específicas que sirvan como patrones se dificulta y retarda, obliga a incrementar exageradamente - el número de casos individuales analizados.

Desafortunadamente, el estudio del metabolismo de la glucosa y las pruebas de tolerancia a la misma presentan un gran número de variables, que no han podido unificarse adecuadamente hasta el presente.

Los principales factores que deben considerarse para la sistematización de los - procedimientos de estudio pueden dividirse en tres grupos, que son :

1) Factores individuales :

Herencia.

Sexo.

Edad.

Talla.

Peso.

Actividad.

Estado nutricional.

Estado de salud integral.

Terapéutica previa.

Reactividad emocional.

Clima.

2) Factores metodológicos:

Preparación dietológica y/o farmacológica previa al estudio.

Duración del ayuno anterior a la prueba.

Calidad de la carga (alimento o glucosa).

Cantidad calórica de la carga.

Volúmen del alimento o del solvente de la glucosa.

Número de dosis de la carga.

Vía de administración de la glucosa.

Frecuencia y número de muestras sanguíneas obtenidas.

Calidad arterial, capilar o venosa de la muestra.

Intención interpretativa (detección masiva o diagnóstico individual de casos problema).

3) Técnicas analíticas:

Método analítico seleccionado (Folin-Wu, Somogyi-Nelson, Hoffman, o-Toluidina, reflectométrico, etc.).

Calidad de la muestra de ensayo (sangre total, suero o plasma). Tiempo transcurrido entre la obtención y el procesamiento de la muestra.

Calidad y calibración de los instrumentos colorimétricos y espectrofotométricos de lectura.

Error humano.

Avances científicos que impongan modificaciones.

Aun cuando la pluralidad de las variables enunciadas puede conducir a largas discusiones, el tiempo y la investigación han logrado unificar algunos criterios, por lo cual haremos referencia a métodos difundidos ampliamente y aceptados por sectores científicos extranjeros importantes y también nacionales.

Antes de discutir las características básicas de los métodos, debe quedar asentado perfectamente que las pruebas de tolerancia a la glucosa deben dividirse según su propósito general en :

Pruebas para detección masiva (campanías de medicina preventiva en grandes grupos de población) y pruebas de detección individual (utilizadas por el especialista en pacientes de diagnóstico y tratamiento complicados).

Pruebas para detección masiva. Carga oral de 50 g de glucosa en solución acuosa al 25%, sin ninguna preparación previa. Una sola muestra de sangre venosa a los 60 minutos.

Criterio diabetológico: más de 166 mg/dl.

Carga oral de 100 g de glucosa, bajo las mismas condiciones del método precedente.

Criterio diagnóstico: más de 177 mg/dl a los 60 minutos.

Carga oral de 30 g de glucosa por metro cuadrado de superficie corporal, muestreo capilar a los 60 minutos. Criterio diagnóstico: más de 154 mg/dl.

Carga oral de 50 g de glucosa, muestreo capilar a los 60 y 120 minutos posteriores.

Criterio diagnóstico: más de 194 mg/dl a los 60 minutos y más de 121 mg/dl a los 120 minutos.

Carga de 1.75 g/Kg de peso corporal, muestra de sangre venosa a los 60 y 120 minutos.

Criterio diabetológico: más de 174 mg/dl (60 min.), más de 145 mg/dl (120 min.).

Carga oral de 50 g de glucosa en 250 ml de agua para ser tomada en un tiempo no mayor de 5 minutos si el paciente tiene menos de tres horas de ayuno.

Mismo procedimiento con 75 g de glucosa si el ayuno es superior a las tres horas.

Muestreo por punción capilar a los 60 minutos para lectura por Dextroxtix.

Si la lectura del Dextroxtix demuestra niveles de glucosa inferiores a 40 mg/dl o comprendidos entre los 130 y 200 mg/dl el paciente será sometido a prueba de tolerancia a la glucosa individual.

La determinación de la glucosa será por el método de o-toluidina en plasma.

Pruebas de tolerancia a la glucosa utilizadas para el diagnóstico individual -- (casos sospechosos).

Prueba por vía oral: En el cuadro siguiente se encuentra el nombre y procedencia de los métodos, las normas de preparación del paciente previas a la carga de glucosa, la dosis y la preparación de la carga, así como la calidad, frecuencia y número de muestras obtenidas.

Prueba de tolerancia a la glucosa por vía endovenosa. Este procedimiento es de valor en los casos en que haya alteraciones gastrointestinales manifiestas, que impidan en una u otra forma la absorción de la carga de glucosa por vía oral.

Este método se hace bajo la secuencia siguiente:

Ayuno superior a tres horas.

Aplicación endovenosa de 330 mg de glucosa por Kg de peso real del paciente (0.66 ml/Kg, de solución glucosada al 50%).

El tiempo de aplicación endovenosa será de 8 minutos.

Muestreo de sangre venosa para obtención de plasma inmediatamente antes de la carga y a los 15, 30, y 60 minutos posteriores.

Se consideran como cifras máximas normales o mínimas patológicas, las de 110 mg/dl - en ayuno y 160, 100 y 65 mg/dl a los 15, 30 y 60 minutos respectivamente.

El procedimiento endovenoso no debe ser considerado como ideal, puesto que al evitar el tránsito de la glucosa a través de la pared intestinal, se evita la participación de enzimas intestinales que estimulan la liberación de insulina (secretina, pancreozimina y glucagon intestinal).

Glucosa a las 2 horas de estado postprandial.

Como la muestra tomada a las 2 horas en una prueba de tolerancia a la glucosa tiene la máxima importancia en la evaluación de diabetes, se puede abreviar la prueba para fines eliminatorios a una sola determinación. El paciente consume su desayuno, almuerzo o la solución de glucosa, con un contenido de 100 g de glúcidos. Dos --

PROCEDENCIA CIENTIFICA	PREPARACION PREVIA DE 3 DIAS	AYUNO (HORAS)	C A R G A		0'	30'	TIEMPO DE MUESTREO EN MIN. mg./dl DE GLUCOSA EN PLASMA					TECNICA
			GLUCOSA (GRAMOS)	VOLUMEN (ml.)			60'	90'	120'	150'	180'	
A) Universidad de Michigan (Fajans)	Dieta con 250 gr. de glúcidos por día.	Una Noche	1.75/Kg. de peso ideal.	Sol. acuosa al 25%			185	160	140			N. S.
B) Servicio de Salud Pública E. U. A. (Wilkerson)	Dieta con 150 gr. de glúcidos por día.	Una Noche	100	Sol. acuosa al 25%	130 o mas 1 punto		195 ó más 1/2 punto		140 ó más 1/2 punto		125 ó más 1 punto	N. S.
C) Grupo Univer- sidades (U.G.D.P.)	Dieta con 300 gr. de glúcidos por día.	+ de 8 - de 16	40/M ² de superfi- cie cor- poral.	Sol. acuosa al 50%	X		X		X		X	N. S.
D) Laboratorio de Análisis Clínicos (H.G.C.M.R.)	Dieta con 300 gr. de glúcidos por día.	+ de 8 - de 16	40/M ² de superfi- cie cor- poral.	300 agua	110	160	170	140	120		110	O - T
E) Servicio de Endocrino- logía. (H.G.C.M.R.)	Dieta con 300 gr. de glúcidos por día.	+ de 8 - de 16	1/Kg. de Peso real	250 agua	105	145	160	105	80	95	80	N. S. O - T

A) Diabetes = Cifras de glucemia por arriba de los niveles señalados

B) Diabetes = Calificación de 2 puntos ó más, si hay elevación de valores en varias muestras.

C) Diabetes = Resultado de la suma de los cuatro muestreos superior a 600 mg.

D) Diabetes = Cifras de glucemia por arriba de los niveles señalados.

E) Diabetes = Cifras de glucemia por arriba de los niveles señalados.

N.S.) Nelson - Somogyi

O - T) Orto - Toluidina.

horas después de la comida, se le extrae sangre para una determinación de glucosa. Habrá que instruir al paciente para que ingiera la cantidad especificada de glúcidos y para que permanezca en reposo durante un período de 2 horas después de la comida. Hoy en día, muchos médicos piden determinaciones de glucosa a las 2 horas de estado postprandial, como cosa rutinaria, en lugar de niveles de glucosa en ayunas, como guía para la administración del requerimiento de insulina. En las condiciones usuales de hospital, a menudo es difícil, sin embargo, controlar el intervalo de 2 horas con mucha exactitud, pues podría empezar a medirse el tiempo al comienzo, hacia la mitad o al final de la comida de prueba. Para asegurar la uniformidad de la ingestión de glúcidos y el cronometraje exacto, se recomienda usar los 100 g de glucosa en solución rutinariamente como comida de prueba para la determinación de glucosa en sangre postprandial.

DETERMINACION DE GLUCOSA EN LIQUIDOS ORGANICOS.

INTRODUCCION.

En los años recientes, el campo de la química clínica se ha extendido para incluir muchos procedimientos ineficaces al diagnóstico, pero con todos los avances en enzimología, química de esteroides y lípidos, radioisótopos, etc., la determinación de glucosa - sanguínea es aún una de las pruebas que se llevan a cabo con más frecuencia en el laboratorio de química clínica.

Aunque la literatura a que está sujeta la determinación de glucosa llenaría una pequeña librería, pocas han sido las contribuciones desde que Folin y Wu publicaron su clásico procedimiento de reducción del cobre. Principalmente, esto es debido al hecho de — que la mayoría de las metodologías básicas utilizan las propiedades reductoras de la glucosa, y, desafortunadamente la sangre contiene un número de otras sustancias con propiedades reductoras. Por eso, la determinación de "glucosa verdadera" presenta un problema que aún en día no ha sido satisfactoriamente vencido, como lo indica ampliamente la siguiente revisión.

1. REDUCCION DEL CUBRE.

A. Principio:

El cobre cúprico es reducido al estado cuproso por la glucosa cuando son calentados en un medio ligeramente alcalino. El óxido cuproso insoluble puede ser medido de — diferentes maneras.

B. Métodos:

1. Folin y Wu. Estos autores usaron una solución de tartrato cuproalcalina, y originalmente utilizaron el reactivo de fenol de Folin y Denis para la medición — del óxido cuproso. Supuestamente, el reactivo de fenol eliminaba los errores de — bidos a la interferencia por creatinina, creatina y ácido úrico; sin embargo, — esto introdujo un nuevo error de interferencia por el mismo fenol. Este fué — eventualmente reemplazado por un nuevo reactivo preparado con ácidos molibdicoy fosfónico. También para prevenir la reoxidación, la cual ocurría muy rápidamente con agitación excesiva, Folin y Wu idearon el bien conocido tubo de agücar sanguíneo, el cual tiene una constricción arriba de la base.

Los autores reclamaron alta especificidad para su método, llendo tan lejos como para decir que "desde un punto de partida teórico el método parece estar sin — una falla". No hicieron mención de la interferencia por sustancias reductoras no glucídicas, no obstante de haber abandonado el reactivo de fenol, el cual tuvieron que usar originalmente para eliminar tal interferencia. Ellos aún recla-

maron que el nuevo reactivo daba valores más bajos que el original. Sin embargo, si algunas de las declaraciones hechas por estos autores fueron vagas, debería recordarse que ellos trabajaron bajo condiciones que en nuestra ilustrada era debería ser considerada primitiva, y que sus instrumentos visuales para medir el color introdujeron un alto grado de error humano. Sin embargo, cualquier falla que pudo haber tenido su método, fué suficientemente satisfactorio, que hoy, cerca de 50 años y docenas de métodos alternativos más tarde, este es aún el método elegido en los laboratorios.

Algunas faltas del método original tienen que ser corregidas. La intensidad del color del azul de molibdeno se elimina por calentamiento inmediatamente después de la adición del fosfomolibdico, y los estándares de glucosa, que Folin y Wu preservaron por períodos cortos con xileno o tolueno, son ahora estabilizados disolviendo la glucosa en una solución de ácido benzoico.

2. Somogyi y Nelson. Somogyi preparó filtrados con sulfato de zinc e hidróxido sódico para eliminar sustancias reductoras no específicas, las cuales son precipitadas con la proteína por el zinc. Más tarde reemplazó el hidróxido sódico con hidróxido bórico en base a que este eliminaba la necesidad de preparar filtrados separados para sangre total y suero o plasma.

Nelson desarrolló un nuevo reactivo de molibdato, el cual fué preparado con molibdato de amonio, orto-arsenato y ácido sulfúrico. Su propósito fué estabilizar el color final. Luego, en 1952, Somogyi describió el reactivo que se emplea en el tan mencionado método de Nelson-Somogyi, reduciendo las cantidades de cobre y tratado del que originalmente se usó.

3. Benedict ideó un nuevo reactivo cúprico el cual es mucho menos afectado que el de Folin y Wu por sustancias reductoras no específicas. Su reactivo estaba compuesto de carbonato de sodio, alanina, sal de Rochelle, sulfato de cobre y bisulfito de sodio. La especificidad es obtenida del bisulfito, el cual incrementa la cantidad de cobre reducido por una cantidad dada de glucosa y reduce la influencia de sacaroides a un nivel insignificante.

A pesar de las ventajas obvias del método de Benedict sobre el de Folin y Wu este no parece tener alcanzado cualquier grado de popularidad. Una razón puede ser que el reactivo de cobre tiene estabilidad limitada; en suma, el bisulfito de sodio debe ser añadido separadamente, un paso adicional que tiene algo de engorroso.

4. Brown describió una ultramicrotécnica en la cual midió el cobre reducido con neocupreína (2,2'- diquinolina), añadiendo la neocupreína al reactivo de cobre antes de usarlo.
5. Schaffer y Hartman. Estos autores modificaron un procedimiento previamente descrito por Bang y McLean, en el cual el yodato de potasio y yoduro de potasio fueron añadidos al reactivo de cobre. El I_2 liberado por el yodato reacciona con el óxido cuproso para la extensión del óxido cuproso presente, y el I_2 que queda es titulado con tiosulfato y almidón. Se ha publicado muchas versiones de la técnica yodométrica.

11. REDUCCION DE FERRICIANURO.

A. Principio:

El ferricianuro en solución alcalina es reducido por la glucosa (con calentamiento a ferrocianuro. El exceso de ferricianuro o el resultante ferrocianuro puede ser determinado por un número de métodos.

B. Métodos:

1. Hawkins y Van Slyke midieron la actividad reductora de la glucosa cronometrando la desaparición del color amarillo del ferricianuro cuando éste fué reducido a ferrocianuro. Con un filtrado de ácido tungstico representando una dilución 1:5 de sangre, 50 mg de glucosa / dl de sangre redujeron al ferricianuro en 390 segundos, y 300 mg / dl lo redujeron en 80 segundos. Ellos graficaron una curva mostrando los intervalos de tiempo en segundos contra la concentración de glucosa entre estos dos límites. Lo que ellos midieron fué, por supuesto, sustancias reductoras totales.
2. Folin y Malinos añadieron sulfato férrico a la reacción y formaron azul de Prusia (ferrocianuro férrico) por la reacción del ion férrico con el ferrocianuro formado.
3. Hagedorn y Jensen emplearon una técnica de titulación yodométrica por adición de yoduro de potasio al reactivo y titulado con tiosulfato y almidón el I_2 liberado por el exceso de ferricianuro. Este método es aún enteramente usual en Europa, sin embargo, raramente usado en E.U.A.
4. Hoffman midió fotométricamente la disminución en el color amarillo del ferricianuro cuando este era convertido a ferrocianuro incoloro. Este es el método adaptado al autoanalizador por la compañía Technicon.

III. FENOLAS EN ACIDO SULFURICO CONCENTRADO.

A. Principio:

Cuando la glucosa es calentada con ácido sulfúrico concentrado, esta es deshidratada, y se forma hidroximetilfurfural en cantidad proporcional a la cantidad de glucosa presente. La adición de fenol o compuestos fenólicos producen un color por la reacción con el hidroximetilfurfural.

B. Métodos:

1. Antrona (9, 10-dihidro-9-oxantraceno). Dreywood introdujo el reactivo de antrona para la determinación de glúcidos. Morris fué el primero en aplicar la reacción para la determinación de glucosa sanguínea y numerosas modificaciones han sido publicadas.
2. Timol. En 1961, Groger publicó un método usando timol, el cual era una modificación de un método alemán anterior (Schmor).

IV. O-TOLUIDINA.

A. Principio:

Varias aminas aromáticas reaccionan con glucosa en solución de ácido acético caliente y producen derivados coloreados. Entre las aminas propuestas para análisis figuran anilina, bencidina, y o-toluidina. Esta última se condensa con el grupo aldehído de la glucosa y forma una mezcla en equilibrio de una glucosilamina y la base de Schiff correspondiente. El producto final de color verde, tiene una absorción máxima a 630 nm.

B. Metodología:

El filtrado es calentado con el reactivo y un color razonablemente estable se forma. Sin embargo, sus estudios mostraron que los filtrados de Folin-Wu, Nelson Somogyi y ácido tricloroacético daban resultados equivalentes. Dubowski seleccionó el ácido tricloroacético para producir el filtrado, y adoptó un período de calentamiento de 10 minutos como cuestión de conveniencia. Puntualizó que el color máximo es obtenido entre los 10 y 14 minutos, de tal forma que aumentando el tiempo de calentamiento a este intervalo aumentará la sensibilidad para la prueba.

Hyvarinen y Nikkila añadieron tiourea al reactivo para estabilizarlo y Fetaris eliminó la precipitación de proteínas, llevando a cabo la reacción en suero sin tratar.

V. GLUCOSA OXIDASA.

A. Principio:

La glucosa oxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno.

La introducción de la enzima peroxidasa es con el fin de acoplar el peróxido de hidrógeno formado a un aceptor cromogénico de oxígeno. Los compuestos usados como aceptores de oxígeno incluyen a la *o*-dianisidina, *o*-anisidina, *o*-tolidina, indofenol, etc. La glucosa oxidasa tiene mucha especificidad para beta-D-Glucosa. La glucosa en solución existe como 36% de la forma alfa y 64% de la forma beta. Algunos preparados comerciales de glucosa oxidasa contienen una enzima, mutarrotasa, que acelera esta conversión.

B. Métodos:

1. Aquellos que usan el peróxido formado.

a. El doble sistema enzimático (con un aceptor cromogénico de oxígeno).

Los primeros métodos utilizaron *o*-tolidina u *o*-dianisidina como aceptor. Una segunda enzima, peroxidasa, fué añadida al sistema para demoler al peróxido de hidrógeno aprovechable, oxidando el tinte con la formación de un color que podría ser leído espectrofotométricamente. Algunas tiras de papel comercialmente aprovechables para pruebas cualitativas de glucosa hacen uso de esta reacción.

Esta metodología básica ha decaído en años recientes debido a que la *o*-tolidina y *o*-dianisidina se les han encontrado propiedades carcinógenas. Se han hecho intentos para sustituirlas con ferrocianuro de potasio y 2,6-dicloro fenol indofenol, y varias otras sustancias como aceptor, pero estos métodos no han encontrado muchos seguidores.

b. La reacción del peróxido de hidrógeno con yoduro de potasio.

El peróxido de hidrógeno reacciona con yoduro de potasio en presencia de un catalizador (sales de vanadio o molibdeno) para formar yodo libre, el cual puede ser medido espectrofotométricamente, amperométricamente o potenciométricamente. La reacción puede ser llevada a cabo en un paso ulterior permitiendo al yodo reaccionar con un agente cromogénico.

Una variación de este método es la de Simon y colab. quienes añadieron un exceso conocido de tiosulfato de sodio a la mezcla de reacción. El tiosulfato reduce al yodo cuando este es producido. La reacción es detenida en un tiempo específico por una elevación del pH, y el exceso de tiosulfato es de terminado por titulación coulométrica.

c. *Medición directa del peróxido de hidrógeno.*

Tammes y Nordschow determinaron el peróxido de hidrógeno presente por la formación de un complejo rojo estable con xilenol anaranjado y titanio.

Sin embargo, algunas cuestiones acerca de la especificidad y/o precisión de este método podrían ser elevadas considerando los valores comparativos con un método de reducción del ferricianuro obtenidos en 35 sueros.

2. *Los que utilizan la reducción del indofenol.*

Dobrick publicó un método en donde el 2,6-diclorobenceno indofenol era reducido por glucosa en presencia de glucosa oxidasa. La actividad de glucosa fue indicada por la desaparición del color original azul-violeta de indicador en suero. El método fue proyectado a ser usado para abrigar propósitos solamente.

VI. *MÉTODOS DIVERSOS.*

A. *Acido dinitrosalicílico.*

1. *Principio:*

Azúcares reductores reaccionan con ácido dinitrosalicílico (DNSA) para producir un color rojo cuando se calientan en un medio alcalino y en la presencia de fenol.

B. *Cloruro de trifenil tetrazolio.*

1. *Principio:*

El cloruro de trifenil tetrazolio cuando se calienta con un azúcar reductor produce un formazan rojo insoluble en agua.

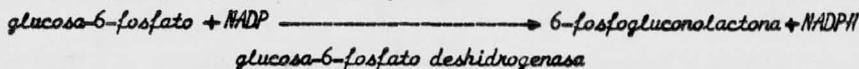
C. *Hexocinasa.*

1. *Principio:*

La glucosa puede ser medida por un doble sistema enzimático usando hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La hexocinasa cataliza la fosforilación de glucosa por el ATP.



La glucosa-6-fosfato es oxidada en la presencia de NADP por la acción catalítica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.



El autor (Stein) usó un filtrado de Somogyi y midió el NADPH formado espectrofotométricamente a 340 ó 366 mμ.

Este método, ha sido usado para la determinación de glucosa en sangre, orina, fluido espinal, y produce resultados de excelente concordancia con el método de glucosa oxidasa.

D. Determinación automatizada de glucosa.

(Método de Hultman, adaptado al autoanalizador por Frings y colab., modificado).

1. Principio:

La glucosa reacciona con *o*-toluidina en ácido acético glacial en presencia de calor, para producir *N*-glucosilamina azul verde, cuya absorbancia es medida a 660 nm.

El método es aplicable a suero o plasma, y no requiere diálisis.

(Technicon, Método de Hoffman, modificación de Brown).

1. Principio:

Este método está basado en la medición de la disminución del color amarillo del ferricianuro cuando este era convertido a ferrocianuro incoloro.

(ABA 100).

1. Principio:

La glucosa puede ser medida por un doble sistema enzimático usando hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La hexocinasa cataliza la fosforilación de glucosa por el ATP, formándose glucosa-6-fosfato más ADP. La glucosa-6-fosfato es oxidada en presencia de NADP por la acción catalítica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en esta reacción se forma 6-fosfogluconolactona más NADPH el cual es medido para dararnos la concentración de glucosa presente.

(Coulter Chemistry).

1. Principio:

Este método está basado en la utilización de la *o*-toluidina.

E. Dextrostix Reflectométrico.

1. Principio:

El método de dextrostix reflectométrico es la combinación de dos procesos: Enzimático y reflectométrico.

El dextrostix es una tira de plástico con una área impregnada que contiene — glucosa oxidasa altamente purificada, peroxidasa y un sistema cromógeno indicador; todo esto cubierto con una capa semipermeable de celulosa que permite el paso de todos los componentes fluidos de la sangre, con excepción de los elementos figurados. La glucosa oxidasa reacciona con la glucosa para remover

dos iones hidrógeno, formando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado, en presencia de peroxidasa, oxida a la o-toluidina (cromógeno), dando una coloración azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de glucosa presente. La coloración producida es leída reflectométricamente.

El reflectómetro es un instrumento que sirve para la determinación de los niveles de glucemia. Utiliza un sistema electroóptico para medir el grado de desarrollo de color en las tiras reactivas, al entrar en reacción una gota de sangre total. La cantidad de luz reflejada del área reactiva es medida, y esta medición es convertida por un circuito electrónico en una lectura expresada en términos de concentración de glucosa sanguínea (mg/dl), en el medidor de la escala del instrumento previamente calibrado.

2. Metodología.

Material:

- a) Reflectómetro.
- b) Cronómetro.
- c) Tiras reactivas dextrostix.
- d) Lancetas.
- e) Torundas de algodón con alcohol.

Material biológico: Sangre capilar.

Técnica:

- 1) Aplicar una gota grande de sangre y extender hasta cubrir completamente el área reactiva en la cara impresa de la tira.
- 2) Esperar exactamente 60 segundos, mantener la tira en posición horizontal.
- 3) Lavar rápidamente durante 1 ó 2 segundos con un chorro fuerte y fino de agua.
- 4) Sacudir la tira y secar el área reactiva.
- 5) Insertar la tira hasta el tope en la guía de la tira.
- 6) Oprimir la tapa del centro y leer el resultado en la escala.

PROCEDIMIENTOS PARA LA DETERMINACION DE GLUCOSA EN LIQUIDOS ORGANICOS.

Método de Nelson-Somogyi.

Reactivos :

1. Sulfato de zinc, solución al 5% (p/v). Se disuelven 50 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ en agua y se diluye la solución a volumen de 1 litro.
2. Hidróxido bórico, solución aproximadamente 0.3 N. Se disuelven 50 g de $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ en agua y se diluye la solución a volumen de 1 litro. Se deja en reposo durante dos días en un recipiente cubierto; se decanta o se filtra. Se guarda en un frasco de polietileno y se protege del bióxido de carbono del aire. Esta solución ha de equilibrarse frente a la solución de sulfato de zinc, como sigue: se vierten con pipeta 10 ml de la solución de sulfato de zinc en un matraz y se diluyen con 25 ml de agua. Se agrega fenolftaleína como indicador y se valora lentamente con la solución de hidróxido de bario, mezclando energicamente hasta color rosa definido permanente. Se diluye el más concentrado de los reactivos, si es necesario, de modo que 10 ml de solución de sulfato de zinc requieran 10 ± 0.1 ml de solución de hidróxido de bario para alcanzar el punto final.
3. Sulfato de cobre, solución. Se disuelven 29 g de Na_2HPO_4 y 40 g de tartrato sódico potásico en 700 ml de agua. Se agregan 100 ml de $NaOH$ 1 N. Se agregan, agitando, 80 ml de solución al 10% (p/v) de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Se agregan 180 g de sulfato de sodio anhidro, se mezcla bien para que se disuelva y se diluye el volumen a 1 litro. Se deja en reposo durante dos días por lo menos, se filtra para separar sales de cobre que pudieran precipitar. El reactivo puede usarse por tiempo indefinido, aunque con permanencia prolongada en reposo pudiera necesitar nueva filtración.
4. Arsenomolibdato, solución. Se disuelven 50 g de molibdato amónico tetrahidratado en una mezcla de 900 ml de agua y 42 ml de H_2SO_4 concentrado. Se disuelven aparte 6 g arseniato sódico heptahidratado en 50 ml de agua y se agrega esta solución a la primera. Se mezcla bien y se incuba a $37^\circ C$ durante 48 horas. Se guarda en un frasco de color ámbar a temperatura ambiente. El color ha de ser amarillo; si es azul verdoso deséchese.
5. Glucosa estándar de depósito, solución al 1%. Se transfiere 1.0 g de glucosa de grado reactivo seca a un matraz volumétrico de 100 ml. Se agrega solución de ácido benzoico al 0.2%; se mezcla hasta disolución, se diluye hasta la marca con solución de ácido benzoico. Se mezcla bien y se guarda la solución en un frasco herméticamente tapado, en el refrigerador. Esta solución es estable por muchos meses.

6. Estándares de trabajo. Se deja calentar a temperatura ambiente una porción del estándar de depósito.

Solución a. Con pipeta se introducen 10 ml del estándar de depósito en un matraz volumétrico de 100 ml y se diluyen hasta la marca con solución de ácido benzoico al 0.2% para tener una concentración de 100 mg/dl.

Solución b. Se introducen con pipeta 10 ml de la solución (a) en un matraz volumétrico de 100 ml y se diluyen hasta la marca con solución de ácido benzoico al 0.2% para tener una concentración de 10 mg/dl. 2 ml de este estándar de trabajo se tratan de la misma manera que un filtrado diluido 1:20 exento de proteínas y correspondiente a una concentración de glucosa en sangre de 200 mg/dl. Se pueden preparar otros estándares de trabajo por dilución de volúmenes proporcionales de solución (a) a 100 ml.

Procedimiento:

1. Se introducen con pipeta, 0.5 ml de sangre, suero, plasma o líquido cefalorraquídeo en un matracito Erlenmeyer. Para esta medición es conveniente usar una pipeta de Ostrald-Folin. (Albumin de suer reoburno específicas)
2. Se agregan 7.5 ml de agua y 1.0 ml de solución de hidróxido bórico. Se mezcla y se deja en reposo durante 30 segundos por lo menos.
3. Se agrega 1.0 ml de solución de sulfato de zinc, se mezcla bien, se deja en reposo durante 2 minutos o más y se filtra o centrifuga. Esto proporciona un filtrado 1:20 exento de proteínas. (Proteinas)
4. Se introducen, con pipeta, 2.0 ml del filtrado o del sobrenadante, en un tubo de Folin para azúcar calibrado a 25 ml. Con cada serie se tratan de la misma manera que el filtrado un testigo (2 ml de agua) y un estándar (2 ml de estándar de trabajo).
5. Se agrega 1.0 ml de solución de sulfato de cobre y se mezcla.
6. Se colocan los tubos en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos y a continuación se enfrían bien en agua fría.
7. Se agrega 1.0 ml de solución de arsenomolibdato y se vuelve a mezclar.
8. Se deja en reposo la mezcla durante 2 minutos por lo menos, se diluye con agua, a 25 ml y se mezcla por inversión de los tubos por lo menos tres veces.
9. Se mide la absorbancia de la muestra y del estándar a 490 nm frente al testigo. La absorbancia es estable a esta longitud de onda por poco tiempo.

Cálculos : $\frac{A \text{ (muestra)}}{A \text{ (estándar)}} \times 200 = \text{mg de glucosa / dl de muestra.}$

Cuando la cantidad de glucosa en la muestra es mayor que 300 mg/dl, se diluye una porción de la muestra de análisis con un volumen igual de agua y se mide la absorbancia frente a una porción del testigo diluida de la misma manera. El resultado se multiplica por 2.

Método de la o-toluidina.

(Método de Hultman, modificado por Dubowski, Hyvarinen y Nikkila).

Reactivos:

1. Reactivo de ácido tungstico (estabilizado). Disolver 1.0 g de alcohol polivinilo — (Elvanal 70-05, Dupont) en cerca de 100 ml de agua con calentamiento ligero. Enfriar y transferir a un matraz volumétrico de 1 litro conteniendo 11.1 g de tungstato sódico grado reactivo, previamente disuelto en cerca de 100 ml de H_2O . Mezclar. En un vaso separado añadir 2.1 ml de H_2SO_4 conc. grado reactivo a 300 ml de agua, mezclar y añadir a la solución de tungstato en el matraz volumétrico. Mezclar y diluir a 1-litro con agua. Este reactivo es estable arriba de un año a temperatura ambiente.
2. Reactivo de o-toluidina (estabilizado). A 5.0 g de tiourea grado reactivo, añadir 90 ml de o-toluidina y diluir a 1 litro con ácido acético glacial. Guardar en una botella ámbar, el reactivo es estable por arriba de 2 años en el refrigerador.
3. Glucosa estándar, 100 mg/dl. Disolver 1.0 g de glucosa anhidra pura (dextrosa) en un litro de agua conteniendo 1.5 g de ácido benzoico. Esta solución es estable por arriba de 2 años en el refrigerador.

Procedimiento para suero o plasma — directo.

1. Transferir 5.0 ml del reactivo de o-toluidina a tubos de ensaye de cerca de 10 ml — de capacidad. Estos tubos pueden ser igualados a tubos de fotómetro o espectrofotómetro si se desea, puesto que la absorbancia final leída puede ser hecha sin transferencia ulterior. Marcar los tubos como "blanco", "estándar", y "desconocido".
2. Añadir 0.1 ml de glucosa estándar (100 mg/dl) al tubo "estándar" (pipeta TC). Mezclar completamente.
3. Añadir 0.1 ml de suero o plasma (pipeta TC) al tubo "desconocido". Mezclar completamente.
4. Aflojar los tapones y colocar los tubos en un baño de agua hirviendo a 100°C. Quitar todos los tubos después de 10 minutos y colocarlos en un baño de agua fría.
5. Cuando todos los tubos estén fríos, leer las absorbancias del "estándar" y "desconocido" contra el "blanco" a 625 nm o con un filtro que tenga una longitud de onda en esta región.

Cálculos :

$$\text{mg de glucosa / dl} = \frac{Ax}{As} \times 0.1 \times \frac{100}{0.1}$$
$$= \frac{Ax}{As} \times 100$$

Procedimiento para fluido cerebroespinal — directo.

Igual que para suero o plasma excepto que se usa una alícuota de 0.2 ml de fluido espinal y añadir 0.1 ml de agua al "estándar" en adición a 0.1 ml de glucosa estándar.

Cálculos :

$$\text{mg de glucosa / dl} = \frac{Ax}{As} \times 0.1 \times \frac{100}{0.2}$$
$$= \frac{Ax}{As} \times 50$$

Procedimiento para sangre total.

1. Preparar una muestra desproteinizada transfiriendo 0.2 ml de sangre en un tubo de ensaye conteniendo 1.8 ml de reactivo de ácido túngstico (estabilizado). Mezclar, reposar 5 minutos, y centrifugar.
2. Añadir a una alícuota de 1.0 ml del centrifugado 5.0 ml del reactivo de o-toluidina, mezclar y marcar "desconocido". Preparar el "blanco" y "estándar" como sigue:
"blanco" : 5.0 ml de reactivo de o-toluidina + 1.0 ml de agua.
"estándar" : 5.0 ml de reactivo de o-toluidina + 0.9 ml de agua + 0.1 ml de glucosa estándar (pipeta TC).
3. Proceder, empezando con el paso 4 del método directo.

Método de glucosa oxidasa.

Reactivos:

1. Soluciones de sulfato de zinc e hidróxido bórico, que se preparan como se describió en el método de Nelson-Somogyi.
2. Solución de glicerina y amortiguador a pH 7.0. Se disuelven 3.48 g de Na_2HPO_4 y 2.12 g de KH_2PO_4 en 600 ml de agua. Se agregan 400 ml de glicerina y se mezcla bien.
3. Reactivo glucosa oxidasa. La preparación de este reactivo a partir de sus componentes ha sido descrita por Fales. Una mezcla adecuada ya empaquetada se vende bajo el nombre de Glucostat (Warrington Biochemical Corporation, Freehold, N.J.). El frasco más pequeño contiene el cromógeno (10 mg de o-dianisidina) y el frasco más grande contiene aproximadamente 125 mg de glucosa oxidasa y 5 mg de peroxidasa. Se disuelve todo el cromógeno soluble en 1.0 ml de agua destilada y se vierte en un frasco de color ámbar. Se disuelve todo el contenido del frasco grande

en el mismo frasquito, y se diluye a 100 ml con la solución de glicerina y amortiguador. Se agrega esta solución al contenido del frasco ámbar y se mezcla bien.

Esta solución se mantiene estable durante 1 mes en el refrigerador.

4. Acido sulfúrico 6 N. Se agregan, mezclando, 200 ml de ácido sulfúrico concentrado a 1 litro de agua destilada.
5. Solución estándar de glucosa, 100 mg/dl en solución de ácido benzoico al 0.2% como se describió para el método de Nelson-Somogyi. Las soluciones estándares preparadas con glucosa seca han de dejarse en reposo durante 2 horas por lo menos para tener la seguridad de que la mutarrotación ha llegado al estado de equilibrio. Las soluciones que van a administrarse para pruebas de tolerancia a glucosa han de prepararse también por lo menos 2 horas antes de usarlas.

Procedimiento:

1. Se prepara un filtrado exento de proteínas al 1:20, de sangre completa, plasma, suero o líquido cefalorraquídeo como se describió para el método de Nelson-Somogyi. Como anticoagulantes son satisfactorios heparina, oxalato o EDTA.
2. Se preparan filtrado de testigo y del estándar de manera idéntica a como se preparó la muestra, con agua y 100 mg/dl de glucosa (estándar), respectivamente.
3. Se calienta a temperatura ambiente el reactivo glucosa oxidasa.
4. Se introducen con pipeta 2.0 ml de cada filtrado en los tubos de ensaye respectivos.
5. Se agrega a cada tubo 1.0 ml del reactivo glucosa oxidasa, uno por uno, en tiempo-cronometrado. Se mezcla el contenido de cada tubo inmediatamente y se colocan los tubos en baño de agua a 37° C.
6. Después de 30 minutos exactamente, se sacan los tubos uno a uno, se agrega a cada uno 5.0 ml de ácido sulfúrico 6 N y se mezcla el contenido de cada tubo. De esta manera se mantiene constante el tiempo de incubación para todos los tubos.
7. Transcurridos 5 minutos, pero en el intervalo de 1 hora, se mide la absorbancia a 540 nm frente al testigo.

Cálculos :

$$\frac{A_x}{A_s} \times 100 = \text{mg de glucosa / dl de muestra}$$

DETERMINACION DE OTROS GLUCIDOS.

Reacción de Selivanoff para fructosa.

El ácido clorhídrico caliente convierte a la fructosa en hidroximetilfurfural, el cual reacciona con resorcinol para formar un compuesto de color rojo.

Reactivos:

Resorcinol. Se disuelven 50 mg de resorcinol en 3.3 ml de ácido clorhídrico concentrado y se diluye la solución con agua hasta 100 ml.

Procedimiento:

Se agregan 0.5 ml de orina a 5 ml de reactivo en un tubo de ensaye y se hierve. La fructosa produce color rojo al cabo de 1-2 minutos. La prueba es sensible a 0.1% de fructosa siempre que no haya exceso de glucosa. Una solución de glucosa al 2% producirá aproximadamente el mismo color que 0.1% de fructosa al cabo de 1/2 minuto de ebullición. Habrá de usarse como control una solución de 0.5% de fructosa. Con altas concentraciones de fructosa se forma un precipitado rojo, que puede separarse por filtración y disolverse en etanol, con formación de una solución de color rojo vivo.

Reacción de Bial para pentosas.

Por calentamiento con ácido clorhídrico, las pentosas se convierten en furfural, el cual reacciona con orcinol formando compuestos de color verde.

Reactivos:

Orcinol. Se disuelven 300 mg de orcinol en 100 ml de ácido clorhídrico concentrado y se agregan 0.25 ml de solución de cloruro férrico al 10%. Si hay glucosa presente en la orina, habrá de separarse antes por fermentación.

Procedimiento:

Se agregan 0.5 ml de orina a 5 ml de reactivo en un tubo de ensaye y se hierve. Las pentosas producen color verde. La prueba es sensible a 0.1% de pentosas. Habrá de usarse una solución de xilosa al 0.5%. Si hay glucuronatos producirán el mismo color si se prolonga la ebullición. La fructosa produce color rojo como con el reactivo de Selivanoff.

INTERPRETACION DE LA CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.

Los procedimientos señalados anteriormente son de gran utilidad para la detección y derivación de los pacientes afectados a su médico tratante; pero, en endocrinología, donde el metabolismo de la glucosa adquiere mayor interés, con frecuencia es necesario adoptar una tecnología más fina y elaborada que queda a juicio del especialista o investigador.

Significado de la glucemia de ayuno.

Se trata de glucemia homeostática, provocada por el efecto glucogenerolítico propiciado por la secreción de aminas vasopresoras y por el glucagon de las células alfa del islote de Langerhans, la actividad prolongada de estas hormonas puede agotar la reserva glucogénica del hígado, y, posiblemente, de la masa muscular. En ciertos casos de ayuno prolongado, stress o estados de hipermetabolismo (crecimiento, ejercicio, fiebre, hipertiroidismo, frío, etc.), debe inferirse que estos niveles de glucosa son mantenidos también por la actividad gluconeogénica de los glucocorticoides adrenales (cortisol).

Glucemia de los 30 minutos.

Es la expresión de la velocidad de absorción de la carga oral de glucosa a nivel intestinal. El hipertiroidismo, el ayuno prolongado, la desnutrición o las dietas bajas en glúcidos previas al estudio, aceleran la absorción y elevan la glucemia de este momento. El retardo de absorción es frecuente observarlo en el hipotiroidismo, en diversos síndromes de mala absorción o durante el uso de drogas neuroplégicas.

Glucemia de los 60 minutos.

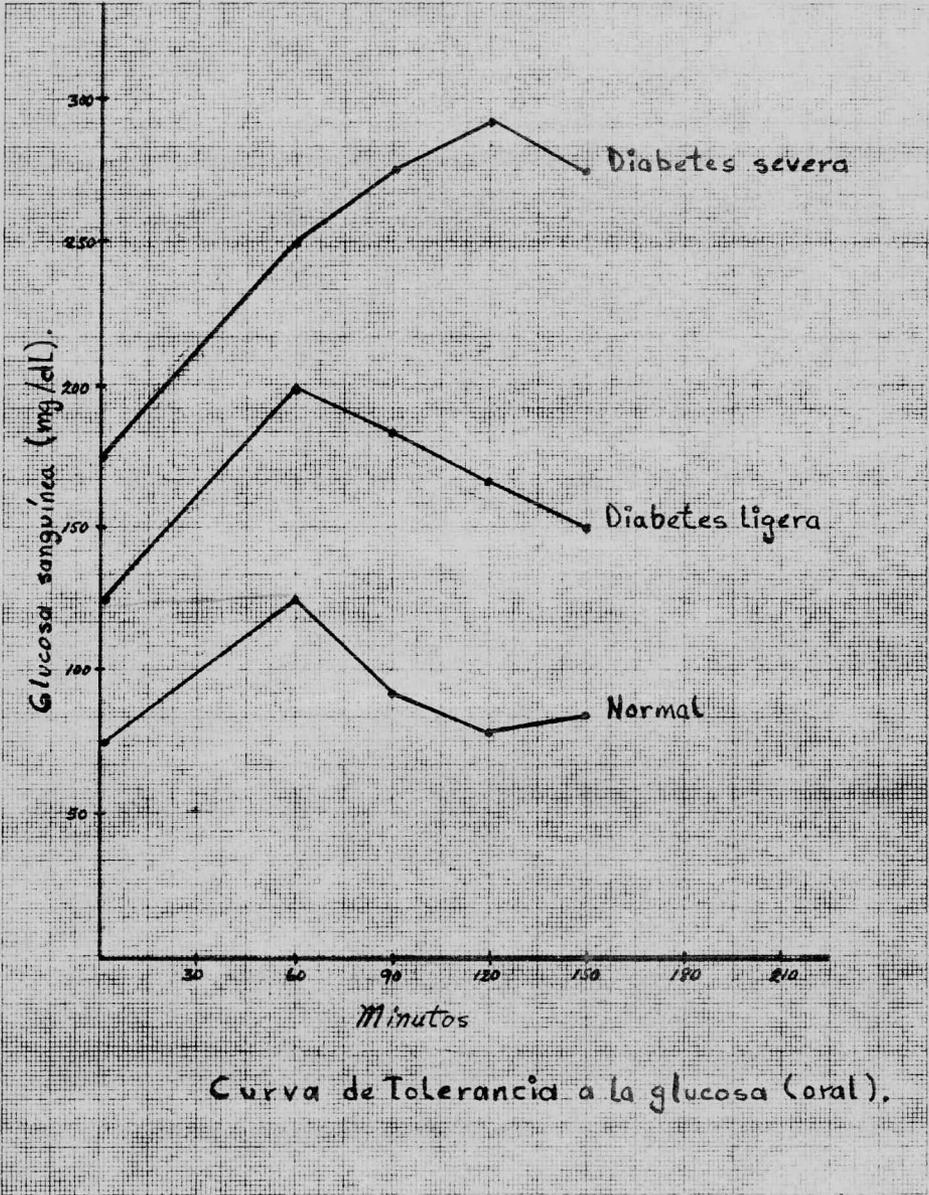
Es habitualmente la glucemia máxima que se observa en las pruebas de tolerancia a la glucosa y expresa la etapa inicial de actividad insulínica, que comienza a promover el descenso de la glucemia debido al aprovechamiento tisular del glúcido. La insulina liberada en esta etapa es aquella llamada de "almacenamiento" (preformada) contenida en los gránulos de las células beta, sumándose además el efecto de la insulina que circula previamente.

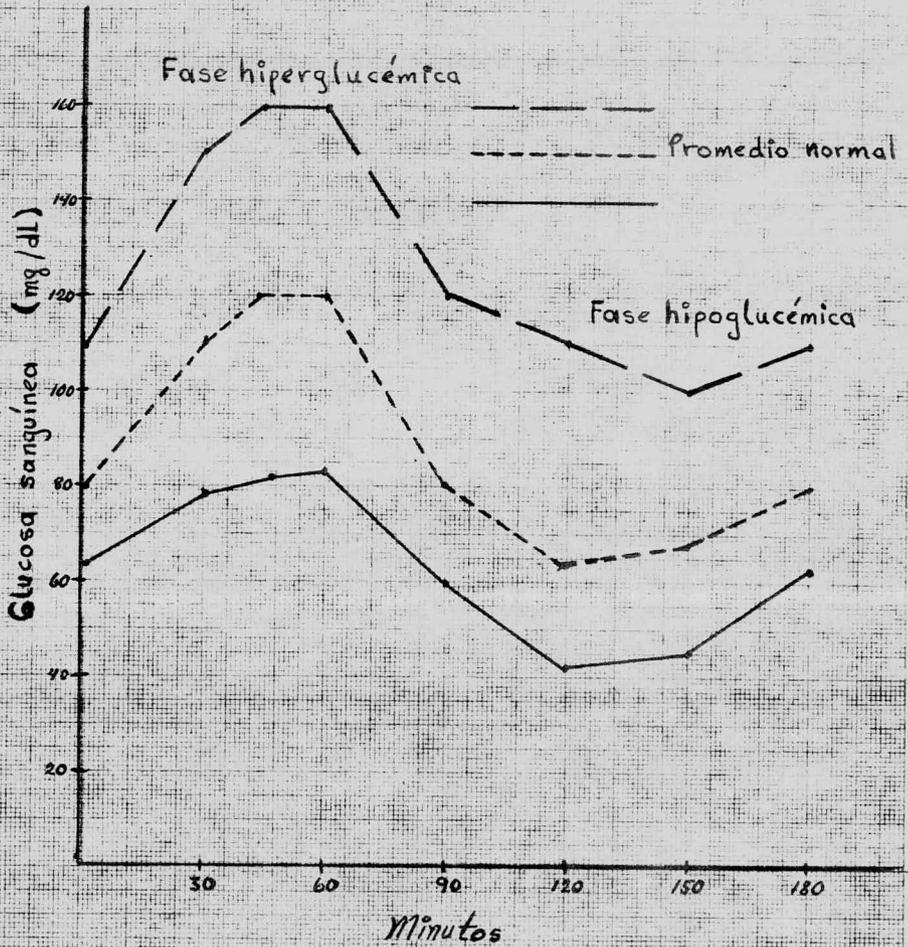
Glucemia de los 90 minutos.

Ilustra el aprovechamiento de la glucosa de la carga, por la liberación de los residuos de insulina del almacenamiento y cantidades progresivamente crecientes de hormona recién sintetizada. En la gran mayoría de los individuos sanos, a los 90 minutos la glucemia se encuentra por esta técnica en niveles muy próximos a la glucemia de ayuno.

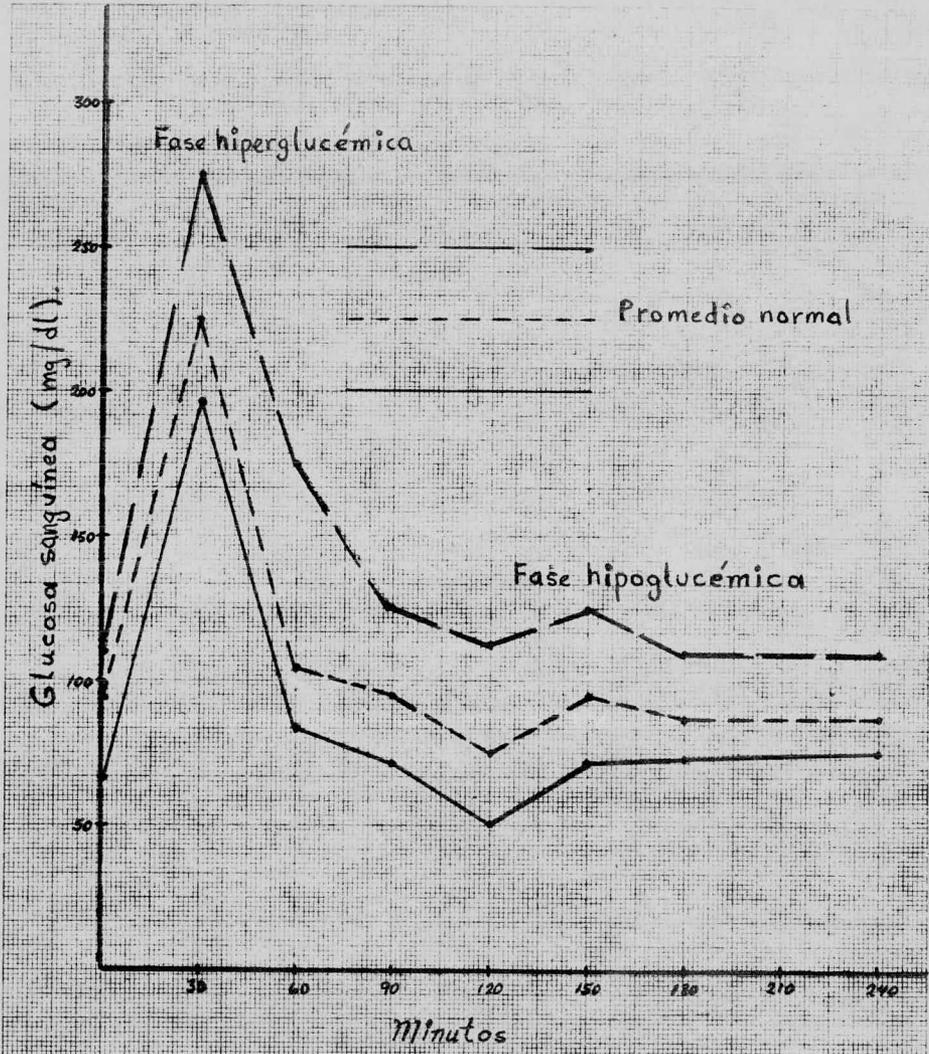
Glucemia de los 120, 150 y 180 minutos.

Los niveles de glucosa en estos lapsos reflejan la etapa final de la actividad insulínica promovida por la carga de glucosa y son expresión de una nueva etapa de glucemia homeostática.





Curva de Tolerancia a la glucosa
(oral)
(Ingestión de 100g de glucosa.)



Curva de Tolerancia a la glucosa (Endovenosa).

En caso de abatirse los niveles de estas muestras a concentraciones inferiores a 70 mg/dl, obligan a suponer que se trata de liberación tardía y sostenida de hormona - (páncreas hiporreactor) o bien, a verdadera hiperinsulinemia en casos de hiperplasia o neoplasias beta insulares.

La falta de abatimiento o hasta el aumento de la glucosa en este período tardío, pertenecen a los estadios de diabetes química o clínica que merecen atención individual o especializada.

Indicaciones y limitaciones de la curva de tolerancia a la glucosa.

La curva de tolerancia a la glucosa está indicada en pacientes cuya glucemia oscile entre 130 y 200 mg/dl, una hora después de haberse practicado los exámenes de detección masiva. Este método, tiene limitaciones en los casos de diabetes clínica, de pacientes que reciben tratamientos con esteroides o cuando se practica con el objeto de conocer la evolución de la diabetes.

INTERPRETACION DE LA DETERMINACION DE GLUCOSA EN LIQUIDOS ORGANICOS.

La concentración normal de glucosa en sangre completa, determinada por métodos muy específicos, varía de 65 a 95 mg/dl. La concentración de glucosa es uniforme en la fase acuosa de plasma y eritrocitos. Como el plasma contiene aproximadamente 12% más agua que la sangre completa, se deduce que la cantidad total de glucosa en 100 ml de plasma es aproximadamente 12% mayor que en 100 ml de sangre completa. El intervalo normal de valores de glucosa en plasma (o suero) se suele dar como 75 a 105 mg/dl. Esta distribución desigual puede ilustrarse asumiendo una concentración de 1 mg de glucosa por ml de la fase acuosa en sangre como sigue:

Muestra analizada	Porcentaje de agua.	mg de glucosa/dl de muestra.
Eritrocitos	73	73
Sangre completa	83	83
Plasma	93	93

Por estos valores resulta evidente que el intervalo "normal" para glucosa en sangre completa variará con el hematócrito. Por esta causa es preferible efectuar determinaciones de glucosa en plasma o suero. Además, los eritrocitos contienen compuestos sulfhidrúlicos, glutatión y ergotioneína, que actúan también como sustancias reductoras e interfieren en procedimientos de determinación de glucosa, a menos que se eliminen estos compuestos antes del análisis.

Estas sustancias reductoras que no son glucosa, llamadas "sacaroides" aumentan los valores de glucosa aparentes en 10-30 mg/dl, aproximadamente, cuando se analiza sangre completa por el método de Folin-Wu. El intervalo normal resultante con la inclusión de sacaroides, llega a ser de 80 a 120 mg/dl y se informa de él como "azúcar en sangre", aunque el término más apropiado sería "total de sustancias reductoras".

A causa de la variación de los valores de referencia para glucosa verdadera en plasma, comparado con sangre completa, y de la relativa falta de especificidad de ciertos métodos de determinación de glucosa, ha surgido confusión en cuanto a la interpretación de valores dados por diferentes laboratorios. No es inusual que un médico efectúe determinaciones de azúcar en sangre en su consultorios por el método de Folin-Wu en sangre completa. También pudiera ser que atendiera pacientes en un hospital en donde el laboratorio informa de glucosa verdadera en sangre completa y en otro hospital en que el laboratorio informa de glucosa en suero. Surgen más dificultades cuando se intentan interpretar cambios consecutivos a una prueba de tolerancia a la glucosa. Si asumimos que el suero contiene 12% más de glucosa que la sangre completa y que el promedio de valores de sacaroides en sangre completa normal es de 20 mg/dl, la relación-

entre los valores sería aproximadamente la siguiente:

<u>Glucosa verdadera (mg/dl)</u>		<u>"Azúcar" reductor (mg/dl)</u>
<u>Sangre completa</u>	<u>Suero</u>	<u>Sangre completa</u>
70	80	90
100	110	120
150	170	170
200	225	220
300	335	320

Así, pues, los valores tomados para el suero fueron obtenidos multiplicando los valores para glucosa verdadera en sangre completa, por 1.12; los valores para "azúcar" reductor en sangre completa fueron obtenidos sumando 20 mg/dl a los valores de glucosa verdadera en sangre completa. Afortunadamente, la mayoría de los métodos aplicados a suero dan resultados con concordancia bastante buena, pues el contenido de sacaroides es bajo y relativamente constante; por consiguiente, la comparación de resultados de diferentes laboratorios se facilitaría usando suero o plasma uniformemente para — las determinaciones de glucosa.

C A P I T U L O 4.

D I S C U S I O N

DISCUSION SOBRE LA METODOLOGIA.

REDUCCION DEL COBRE.

De los tres mejor conocidos métodos de reducción del cobre, uno (Folin-Wu) mide sustancias reductoras totales, (Nelson-Somogyi) remueve tales sustancias por el uso de un filtrado especial, y (Benedict) remueve la interferencia de estas sustancias - por el uso de un reactivo especial de cobre. El término "sacaroides" fue introducido - por Benedict para designar las sustancias reductoras no glucídicas, no fermentables - que se encuentran en la sangre. Los principales sacaroides en sangre son creatinina, ácido glucourónico, glutatión y ácido úrico.

REDUCCION DE FERRICIANURO.

De acuerdo a Sunderman y asoc. (15), el método del ferricianuro, como los métodos de reducción del cobre, miden sustancias reductoras totales. Por lo tanto, es necesario usar un filtrado (como el de Somogyi) para remover las sustancias no específicas si se quieren obtener valores de azúcar verdadera. Una ventaja del método del ferricianuro sobre el de reducción del cobre es el hecho de que el ferricianuro no es reoxidado rápidamente, de tal manera que los tubos especiales y otras precauciones no son necesarias.

FENOLES EN ACIDO SULFURICO CONCENTRADO.

Se han probado algunos otros compuestos fenólicos y han sido enumerados por Henry (19). Estos no miden sacaroides, lo cual les da al menos una ventaja sobre los métodos de reducción.

O-TOLUIDINA.

Atharail y Cabaud (23) usaron 2-aminofenol en ácido acético glacial en una modificación a un método de Timell y col. (24). El reactivo era inestable y subsecuentemente resultó ser carcinógeno. Hultman (25) fue el primero en usar o-toluidina para la estimación de aldosas y cetosas. Dubowski desarrolló un procedimiento para la determinación de glucosa sanguínea basado en una sugestión personal de Forsell. El no hizo referencia al uso del compuesto de Hultman. Dubowski encontró dos picos de absorción, a 480 y 630 nm, con adherencia a la ley de Beer ambos picos, pero con gran sensibilidad a 630 nm. Hyvarinen y Nikhila encontraron que la adición de tiourea casi eliminaba la lectura del "blanco" y causaba la desaparición del pico de absorción a 480 nm.

La reacción de la o-toluidina es selectiva y en sangre es específica para la glucosa. Su retiro de la práctica, son la inestabilidad del reactivo (aun con la adi-

-ción de tiourea su estabilidad es limitada a cerca de dos meses), y la falta de linealidad del color.

En 1963, Stroes y Zondag (26) usaron fenilhidracina en ácido acético glacial, indicando que la *o*-toluidina daba resultados bajos; en 1967, Gros y Smekeer (27) la substituyeron con anilina, reclamando gran estabilidad para su reactivo. Encontraron un pico de absorción a 378 nm y la utilizaron.

GLUCOSA OXIDASA.

Middleton y Griffiths (39) fueron entre los primeros que publicaron un método de glucosa oxidasa para uso en el laboratorio clínico. Utilizaron el sistema enzimático -doble con *o*-toluidina como aceptor de oxígeno, y encontraron que el rango normal (en ayunas) era de 50-90 mg/dl. Marks (40) encontró los mismos límites normales. Los siguientes rangos normales en ayunas fueron encontrados por otros investigadores:

Kingsley y Getchell (41), 63-85 mg/dl, Robin y Saifer (42) (con un sistema automatizado) 70-105 mg/dl, Tammes y Mordschow (37) 49-96 mg/dl.

Adams y colab. (43) en un estudio de la especificidad de la glucosa oxidasa presentaron datos demostrando que la velocidad de oxidación de la glucosa es limitada por la cantidad de glucosa presente, y que aunque algo de la forma alfa es convertida en beta, la mutarrotación completa nunca es alcanzada.

El problema de la mutarrotación, sin embargo, parece ser más teórico que actual.

Otra interferencia más lejana con el sistema proviene de sustancias presentes en la sangre, las cuales compiten con el aceptor (cromogénico o yoduro de potasio) para el oxígeno formado. Entre las principales están el ácido ascórbico, ácido úrico, glutatión y bilirrubina.

La mayoría de los investigadores han encontrado que la precipitación de proteínas con el sistema hidróxido de bario de Somogyi es el medio más satisfactorio de remover sustancias que interfieren que un filtrado de ácido tungstico. Martineck (44) establece que el procedimiento de Somogyi remueve ácido úrico, creatinina, hemoglobina, bilirrubina, ácido ascórbico y catecolaminas. Morley y colab. (45) establecen que la precipitación de Somogyi remueven glutatión y ácido ascórbico.

Fales y colab. (46) dicen que el glutatión está presente en los filtrados de ácido tungstico de sangre total, pero que en la determinación de glucosa en suero o plasma tales filtrados pueden ser admisibles debido a que el glutatión reside casi totalmente en los eritrocitos. Welch y Danielson (47) demostraron que el orden en el cual los reactivos precipitantes fueron añadidas en el sistema de Somogyi tuvieron un efecto significativo en los valores obtenidos.

Sin embargo, el sistema de precipitación de proteínas no removerá completamente todas las sustancias que interfieren. Otros medios de eliminarlas incluyen resinas - de intercambio iónico (para orina) (48), diálisis (para procedimientos automáticos) - (49) y previa incubación con yodo (31).

Con lo dicho anteriormente, parecería que un método completamente satisfactorio para la utilización de glucosa oxidasa en la determinación de glucosa sanguínea todavía no se ha encontrado.

ACIDO DINITROSALICILICO.

El DNSA fue usado primero por Sumner (50) para prueba de azúcar en orina de diabéticos. Esta fue subsecuentemente refinada y modificada para uso en la estimación de azúcar sanguíneo por Leech y Woodford (51), Sumner y Sisler (52), Lee (53), Mohun y Cook (54) y Luchsinger y Cornesky (55).

Bajo las condiciones desarrolladas por los primeros tres autores de los arriba mencionados, el color fue marcadamente no-lineal bajo 70 mg/dl.

Mohun y Cook corrigieron esto por adición de glucosa al reactivo en orden, para mantener la concentración de glucosa en la mezcla final en el mínimo requerido para linealidad.

Mamose y colab. (56) substituyeron el DNSA por ácido dinitroftálico, reclamando gran sensibilidad.

CLORURO DE TRIFENIL TETRAZOLIO.

Esta reacción fue primero usada como prueba para azúcares reductores (57).

Mattson y Jensen (58) la adaptaron para la determinación cuantitativa de azúcar sanguíneo, disolviendo el formazan en piridina ácida. La reacción fue llevada a cabo a $25^{\circ} \text{C} \pm 1$, siendo muy sensible para despreciar cambios en la temperatura.

DETERMINACION AUTOMATIZADA DE GLUCOSA.

(Método de Hultman, adaptado al autoanalizador por Frings y colab., modificado).

La intensidad del color producida por una cantidad dada de glucosa es una función de la composición del reactivo (diferentes lotes de o-toluidina pueden producir reactivos más o menos sensibles), el tiempo de los reactivos (reactivos viejos dan menos color), y el tiempo de calentamiento y temperatura. Esto es importante, se recomienda un tiempo de 10 minutos y una temperatura de 100°C .

Substancias que interfieren: La hemoglobina arriba de 350 mg/dl y la bilirrubina arriba de 20 mg/dl no interfieren en el método directo (sin desproteínización).

Grandes concentraciones de hemoglobina dan por resultado errores positivos y bilirrubina errores negativos. Ambas fuentes de interferencia son eliminadas por desproteínización con ácido túngstico.

De los métodos para la determinación de glucosa en líquidos orgánicos tratados en este trabajo, el de mayor uso actualmente es el de la o-toluidina. Debido a su alta especificidad, simplicidad y aplicabilidad a sueros sin desproteinización.

Puesto que la reacción no está basada en las propiedades reductoras de la glucosa, solo unos pocos compuestos que ocurren fisiológicamente reaccionan con la o-toluidina para producir sustancias absorbentes de la longitud de onda usada para medir el compuesto colorido formado con la glucosa.

En este método la galactosa, manosa y en menor grado lactosa y xilosa son fuentes potenciales de error, pero éstas no están normalmente presentes en suero o plasma en cantidades significantes.

Considerando una serie de factores como son: susceptibilidad de los métodos enzimáticos a inhibidores, costo de los reactivos, estabilidad de los reactivos, tiempo y facilidad de ejecución, el método de la o-toluidina ya sea automatizado o manual es el de elección en el laboratorio de química clínica de rutina.

C A P I T U L O 5.

C O N C L U S I O N E S

Debido a que los glúcidos son de gran importancia clínica, es necesario estudiar su metabolismo, fisiología y alteraciones para detectar una serie de padecimientos .

El de mayor importancia es la diabetes mellitus, ya que es una afección que — ocurre casi en el 25% de la población mundial, además de ser un padecimiento crónico incurable, altamente incapacitante, de control privado o institucional costosos, es necesario buscar y establecer métodos analíticos rápidos, fáciles y precisos, para su detección y tratamiento consecutivo.

Actualmente existen infinidad de métodos para la determinación de glucosa, estos nos permiten la estimación de niveles de glucosa circulante en un momento dado, pero no informan sobre las variaciones derivadas del aprovechamiento orgánico de la glucosa, consecutivas a la ingesta de alimentos, a una carga oral o endovenosa de — glucosa o como resultado de los mecanismo homeostáticos de regulación de la glucemia durante el ayuno.

Para conocer estos fenómenos es necesario hacer muestreos sucesivos, en lapsos predeterminados y bajo condiciones específicas. Esto se logra mediante la prueba de tolerancia a la glucosa.

B I B L I O G R A F I A

CAPITULO 1.

Harold A. Harper

Manual de Química Fisiológica

5a. Edición (1976)

Ed. El manual moderna S.A. (México).

William F. Ganong

Manual de Fisiología Médica

5a. Edición (1976)

Ed. El manual moderno S.A. (México).

White Abraham, Philip Handler, Emil L. Smith

Principles of Biochemistry

Fifth edition (1973)

McGraw-Hill Book Co. (USA).

Ruch-Patton

Physiology and Biophysics III

20th edition (1973)

W.B. Saunders Co. (USA).

Lozano Castañeda O., Editor.

Memorias // curso panamericano para graduados

"Diabetes mellitus en Medicina General"

México, D.F., pag. 1-17, 1972.

CAPITULO 2.

Lozano Castañeda O., Editor.

Memorias II curso panamericano para graduados

"Diabetes mellitus en Medicina General"

México, D.F., pag. 1 - 17, 1972.

Hoffman S. William

The biochemistry of clinical medicine

Fourth edition (1970)

Year book medical publishers Inc. (USA).

William F. Ganong

Manual de Fisiología Médica

5a. Edición (1976)

Ed. El manual moderno S.A. (México).

CAPITULO 3.

Bravo Guerra R.

Pruebas de tolerancia a la glucosa

Significación, indicaciones e interpretación

Boletín Médico I.M.S.S.

Vol. 15, No. 10, pag. 368-373, 1973.

Monograph by DADE education

A review of glucose methodology

Anna Bell Ham, Department of Chemistry.

Henry J. Richard, Donald C. Cannon, James W. Winkelman

Clinical Chemistry (Principles and Technics)

Second edition (1974)

Harper an Row, Publishers, Inc. (USA).

Tietz Norbert, W.

Química clínica moderna

1a. Edición (1972)

Ed. Interamericana (México).

