

GLUCOLISIS IN VITRO

Ana María Serrano Rodríguez *

Edgar Chavarria Solano **

INTRODUCCION:

Es un asunto de indudable importancia en el laboratorio clínico, la exactitud de las determinaciones que realice. Una gran cantidad de factores, sin embargo, podrían conducir a error. Entre ellos, aquellos que están fuera del control del analista - pequeñas variantes en equipos mecánicos como relojes -, se conocen como errores indeterminantes. (3) Obviamente, son errores determinantes aquellos que pueden ser controlados por el personal que realiza el ensayo. El fenómeno de glucolisis in vitro, podría conducir a error en la determinación de glucosa, si el laboratorio no lo toma en cuenta. Es sabido que el fluoruro de sodio, utilizado como anticoagulante, inhibe la glucolisis por 24 horas a temperatura ambiente. (8). Sin embargo, en la actualidad, y en nuestro medio, con la introducción del método de O-Toluidina para la determinación de glucosa, muchos laboratorios utilizan suero sanguíneo, con lo que el fenómeno de glucolisis participa como posible factor de error que debe ser considerado. Los valores de glucosa en muestras tomadas sin anticoagulante inhibidor del fenómeno, podrían resultar falsamente disminuidas. Este posible factor de error adquiere una importancia aún mayor en la Determinación de la Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa. Si las primeras muestras de la Curva se analizan rápidamente, mientras que las correspondientes a 60, 90 y 120 minutos post ingesta de glucosa, se dejan para ser analizadas junto con la muestra de 180 minutos post ingesta, el resultado de la Curva podría ser tendencialmente falso. Tendríamos resultados válidos para las muestras de ayuno, 30 y 180 minutos post ingesta y, valores falsamente disminuidos en las muestras de 60, 90 y 120 post ingesta.

* M.Q.C., C.C.S.S., Clínica de San Ramón.

** Técnico Laboralista C.C.S.S., Desamparados. Clínica Dr. Marcial Fallas Díaz. Miembro fundador de la Asociación Costarricense de Historia de la Ciencia y la Tecnología.

GLUCOLISIS IN VIVO:

Este es el mecanismo metabólico al que recurren muchas células, bacterias y tejidos como medio para obtener la energía necesaria para sus funciones vitales, a partir del desdoblamiento de la glucosa. Existen dos vías en el metabolismo de la glucosa.

a.- **Vía anaeróbica:** la glucosa se desdobla produciendo ácido pirúvico, gracias a una serie de reacciones enzimáticas que no requieren de oxígeno. Este sistema es poco eficaz, sólo se obtiene un 10% (2 A.T.P.) de la energía total liberada. Casi todos los tejidos tienen como primer etapa el anaeróbico. Si no se dispone de suficiente oxígeno, (por ejemplo en el músculo, durante el ejercicio), el ácido pirúvico se reduce a ácido láctico, es transportado por la sangre al hígado donde es oxidado a ácido pirúvico.

b.- **Vía aeróbica:** en esta fase, el ácido pirúvico, por la intervención de enzimas y cofactores, es oxidado en presencia de oxígeno, dando como productos finales CO_2 y H_2O . De este proceso se obtiene el mayor rendimiento energético (38 A.T.P.). (8, 11).

GLUCOLISIS IN VITRO:

Este fenómeno se produce en sangres dejadas en condiciones adecuadas para su procesamiento. Tanto en los eritrocitos, como en los leucocitos, por la presencia de sistemas enzimáticos, en los que figuran enzimas como las catalasas, lipasas, proteasas, son capaces de desencadenar la glucolisis in vitro. (4). Los leucocitos juegan un papel muy importante, pues se ha comprobado, un aumento notable de la glucolisis en sangre leucémica. (2). Existen una serie de factores que afectan la glucolisis in vitro, entre los que pueden ser citados: TEMPERATURA: a temperaturas bajas hay inhibición de la glucolisis. A 37 y 40 grados centígrados.

la estimula, mientras que a 56 grados centígrados, se detiene. ELEMENTOS FIGURADOS. Se ve afectada principalmente por los polimorfonucleares, dada la gran cantidad de enzimas en ellas que favorecen el fenómeno. (2, 9, 10). ESTADOS PATOLOGICOS: El fenómeno disminuye en la diabetes y se aumenta en la nefritis y la leucemia mielocítica. (2, 4) ANTICOAGULANTES: El fluoruro de sodio actuando como veneno enzimático, inhibe la glucólisis. (8). Todos estos hechos y las consideraciones sobre ellos, motivaron el presente estudio sobre glucólisis in vitro y sus posibles manifestaciones en el laboratorio clínico.

MATERIAL Y METODOS:

Las determinaciones de glucosa se realizaron en suero, haciendo uso del método de O-Toluidina modificado.

REACTIVOS:

1.- Reactivo de O - Toluidina:
Tiourea, 1 gramo por litro;
Acido Acético, 633.3 ml. por litro;
O - Toluidina, 33.3 ml. por litro.

STANDARD:

200 miligramos de glucosa en 100 ml. de ácido benzoico 0.2 %.

REACCION DE COLOR:

Este método se basa en la propiedad de varias aminas aromáticas, - entre ellas, O - Toluidina - de reaccionar con la glucosa en ácido acético caliente, produciendo derivados coloreados. La O - Toluidina se condensa con el grupo aldehído de la glucosa, formando una glucosamida y la base de Schiff. El compuesto coloreado final, posee una absorción de luz (absorbance) máxima a 630 nm). Tanto la galactosa como la lactosa reaccionan en la misma forma, por lo que esta técnica puede usarse para evaluar pruebas de tolerancia a ambos azúcares.

METODOLOGIA:

Se investigó una totalidad de cien casos. A cada uno se le tomó dos muestras de sangre en tubos sin anticoagulante. Una de las dos muestras tomadas, se centrifuga a los 30 minutos después de haber sido extraída. Se separa el suero y se determina la glucosa. Cuatro horas después de haber sido tomadas las muestras, se centrifuga el segundo tubo. Se separa el suero y se determina la glucosa. Paralelo a esta segunda determinación, se vuelven a analizar los sueros de las primeras muestras, centrifugados a los 30 minutos después de haber sido extraídos. Con los datos obtenidos, se procedió a establecer los niveles de glucólisis.

	BLANCO	STANDARD	PROBLEMA
H ₂ O destilada	0, 1 ml.	-	-
Standar 100 mg. %	-	0,1 ml.	-
Muestra	-	-	0,1 ml.
Reactivo de O-Toluidina	6 ml.	6 ml.	6 ml.
Colocar los tubos en agua hirviendo durante 10 minutos.			
Enfriar colocando los tubos en agua fría por cinco minutos.			
Leer contra blanco a 630 nm. en espectrofotómetro.			
El color es estable por 30 minutos.			

CUADRO NUMERO UNO

RESULTADOS

CASO No.	PRIMER MUESTRA 0 Horas.	PRIMER MUESTRA 4 Horas.	SEGUNDA MUESTRA 4 Horas.	Dif. en mg. ^o /o	PORCENT. DE GLUC.
1	85 mg	85 mg	49,8 mg	35,2 mg	41 ^o /o
2	85	84	64	21	24
3	142	142	108	34	23
4	135	132	100	35	25
5	100	99	76	24	24
6	108	107	76	32	29
7	82 mg	80 mg	62 mg	20 mg	24 ^o /o
8	82	82	53	29	35
9	89	87	60	29	32
10	164	160	128	36	22
11	92	91	64	28	30
12	97	95	74	23	24
13	111	110	80	31	28
14	105	101	65	39	37
15	118	118	82	36	30
16	95	92	65	30	31
17	80	80	62	18	22
18	142	140	115	27	19
19	172	169	148	24	14
20	95	95	71	24	25
21	92	90	60	32	35
22	114	111	89	25	22
23	95	95	76	19	20
24	100	97	67	33	33
25	97	97	69	28	29
26	105	105	65	40	38
27	73	70	38	35	48
28	82	80	62	20	24
29	82	82	65	17	21
30	102	101	65	37	36
31	302	300	264	38	12
32	89	87	64	25	28
33	92 mg	89 mg	65 mg	27 mg	29 ^o /o
34	97	97	69	28	29
35	82	82	65	17	21
36	92	91	74	18	19

37	95	91	64	31	33
38	108	108	78	30	27
39	102	100	65	37	36
40	97	95	65	32	33
41	92	90	58	34	37
42	118	118	53	65	55
43	82	82	54	28	34
44	72	70	60	12	16
45	82	82	66	16	19
46	87	87	66	21	24
47	90	87	72	18	20
48	82	82	58	24	29
49	76	73	48	28	37
50	201	199	179	22	11
51	95	93	72	23	24
52	80	80	60	20	25
53	95	95	74	21	22
54	90	87	64	26	28
55	82	80	52	30	36
56	85	82	68	17	20
57	85	85	68	17	20
58	103	100	64	39	38
59	128 mg	125 mg	94 mg	34 mg	26 %
60	92	90	76	16	17
61	82	82	68	14	17
62	95	95	76	19	20
63	87	85	64	23	26
64	94	91	78	16	17
65	87	85	62	25	29
66	189	185	157	32	17
67	66	63	44	22	33
68	92	90	76	16	17
69	103	100	70	33	32
70	70	70	45	25	36
71	80	78	51	29	36
72	332	330	304	28	8.5
73	109	105	74	35	32
74	70	70	42	28	40
75	103	100	82	21	20
76	147	147	135	12	8
77	82	82	60	22	27
78	94	90	74	20	21
79	140	140	100	40	28
80	202	200	158	44	21
81	87	85	70	17	19
82	90	90	66	24	26

83	342	342	296	46	13
84	90	90	72	18	20
85	94 mg	91 mg	76 mg	18 mg	19 %
86	118	118	97	21	17
87	103	103	80	23	29
88	90	89	62	28	31
89	115	115	92	23	20
90	95	93	74	21	22
91	87	85	62	25	29
92	304	300	296	8	3
93	128	124	100	28	22
94	202	202	179	23	11
95	90	90	76	14	15
96	95	92	64	31	33
97	82	82	65	17	21
98	105	105	65	40	38
99	103	100	82	21	20
100	66	63	44	22	33

Nota: En el cuadro precedente, la diferencia en mg. % y el porcentaje de glucolisis, se establece con los valores obtenidos del análisis de la primera muestra (0 horas) y los de la segunda muestra (4 horas). Esto por cuanto las diferencias obtenidas en los dos análisis efectuados a la primera muestra (0 y 4 horas) no apuntan diferencias significativas.

CUADRO NUMERO DOS

FRECUENCIA DE PORCENTAJES DE GLUCOLISIS		
CLASES	TOTAL	DIABÉTICOS
0 - 10 %	3	3
11 - 20	25	7
21 - 30	43	7
31 - 40	26	0
41 - 50	2	0
51 - 60	1	0
TOTAL	100	17

Nota: Obsérvese que el cien por ciento de casos de diabéticos, muestran bajos porcentajes de glucolisis.

CUADRO NUMERO TRES

INDICE PROMEDIO DE GLUCOLISIS EN 4 Hs.	26,3 mg %
PORCENTAJE PROMEDIO DE GLUCOLISIS EN 4 Hs.	25,6 %
INDICE PROMEDIO DE GLUCOLISIS POR HORA.	6,6 mg %
PORCENTAJE PROMEDIO DE GLUCOLISIS POR HORA.	6,41 %

DISCUSION:

Por ser la glucosa la Fuente de energía más importante para todas las células, y encontrarse en plasma en cantidades representativas del metabolismo y del equilibrio entre células y plasma, es de suma importancia una determinación exacta de la glucosa y de los factores

que modifican la concentración de este metabolito en la circulación. La variedad de factores que afectan la glucolisis in vitro son considerables y, su acción exacta, aún desconocida. Dada esa diversidad de factores que intervienen en la glucolisis, los índices en que este fenómeno se manifiesta, varían considerablemente de una muestra a otra, aún cuando el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y la realización de la prueba, sea constante. En el cuadro número uno encontramos que los sueros separados a los treinta minutos después de tomada la muestra, revelan valores estables a las cuatro horas posteriores. Sin embargo, las muestras cuyo suero fue separado cuatro horas después de extraídas, revelan un alto índice de glucolisis que va desde un 3% hasta un 55 %. Hemos encontrado también, que el fenómeno de glucolisis disminuye tendencialmente en las muestras de pacientes diabéticos. Así, el porcentaje más bajo de glucolisis, 3 %, se ha encontrado en una muestra cuya concentración de glucosa es de 304 mg %. Para una muestra de 332 mg % de glucosa, encontramos una glucolisis de 8,5 % y así sucesivamente. Por otra parte, el porcentaje más alto de glucolisis ha sido encontrado en una muestra con una concentración de glucosa de 118 mg %. Los valores promedios señalados en el cuadro número tres, deben considerarse sólo datos estadísticos sin aplicación práctica inmediata (como podría ser un factor de corrección) debido a la heterogeneidad en el comportamiento del fenómeno en cuestión derivado de los múltiples factores que en él intervienen.

RESUMEN:

Se comenta brevemente algunos aspectos de la glucolisis in vitro e in vivo. Se señalan los resultados obtenidos en cien casos estudiados para determinar índices de glucolisis en cuatro horas. Se indica que en muestras cuyos sueros fueron separados cuatro horas después de tomada la muestra, aparecen índices de glucolisis que van del 3 al 55 por ciento. De la misma manera se observa que, los sueros que fueron separados treinta minutos después de tomada la muestra, revelan valores estables cuatro horas después. Finalmente se señala que el fenómeno no tiene un comportamiento homogéneo debido a la gran variedad de factores que en él intervienen, y se comprueba que las muestras

de pacientes diabéticos, muestran — tendencialmente —, un bajo porcentaje de glucolisis.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Bermejo, V.L.; QUIMICA ORGANIZA; Madrid 1940; Editorial Librería General de Victoriano Suárez, 2 T.
- 2.- Coronas Leonidas; QUIMICA NORMAL Y PATOLOGICA DE LA SANGRE; Chile 1948, Edit. Zig Zag.
- 3.- Dade, Boletín Informativo; CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE QUIMICA CLINICA; Miami 1968.
- 4.- Deulofeu, V. y Marens, A.; CURSO DE QUIMICA BIOLOGICA, Córdoba 1957, Edit. Ateneo, Sexta edición.
- 5.- Dubowski, K.; CLIN. CHEM. 8:215, 1962.
- 7.- Harrow, Benjamín, TRATADO DE BIOQUIMICA; México 1967, Edit. Interamericana, sexta edición.
- 8.- Lynch et al; METODOS DE LABORATORIO; México 1969, Edit. Interamericana, segunda edición.
- 9.- Meyerhof, Otto; NUEVAS INVESTIGACIONES SOBRE GLUCOLISIS Y FOSFORILACION. FENOMENOS ENZIMATICOS; Filadelfia 1948, Edit. University of Pensilvania.
- 10.- Rondoni, P. COMPENDIO DE BIOQUIMICA; Barcelona 1948, Edit. Labor, quinta edición.
- 11.- Valverde Luis; GLICOLISIS IN VITRO: Tesis de Grado, Universidad de Costa Rica.
- 12.- Vidal, Jorge; QUIMICA ORGANIZA; Buenos Aires 1965; Edit. Stella, 17 edición.
- 13.- White, Emil; FUNDAMENTOS QUIMICOS DE LAS CIENCIAS MEDICAS; México 1967, Edit. Uteha, segunda edición.