

Laboratorio A Determinación de Glucosa

INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos son uno de los principales componentes de la dieta en humanos, debido a la energía que proveen para los procesos metabólicos celulares. Antes que los carbohidratos puedan ser absorbidos y utilizados como fuente de energía, deben ser degradados a monosacáridos. Esta degradación ocurre en el proceso de la digestión.

La digestión empieza en la boca, donde la amilasa salival hidroliza el almidón para formar dextrinas y maltosas. En el estómago, la amilasa salival es inactivada por el pH ácido del jugo gástrico. El pH del intestino delgado es más alcalino, por lo que la digestión del almidón y el glucógeno a maltosa es completada por la amilasa pancreática. La maltosa, conjuntamente con la lactosa y sacarosa ingeridas, son hidrolizadas por las disacaridasas (enzimas de la mucosa intestinal) para formar los monosacáridos glucosa, galactosa y fructosa. Estos monosacáridos son absorbidos por las células intestinales, liberados al torrente sanguíneo, y transportados al hígado por la circulación portal.

Puesto que la glucosa es el único monosacárido utilizado por el organismo como fuente energética, las enzimas hepáticas convierten la galactosa y la fructosa en glucosa. La utilización de la glucosa se realiza en varios pasos; en el primero, en el hígado la glucosa reacciona con el trifosfato de adenosina (ATP), por acción de la enzima hexocinasa, para formar glucosa-6-fosfato; compuesto que sirve como punto de partida para tres vías metabólicas a través de las cuales la glucosa puede ser metabolizada: 1) la vía de la hexosa monofosfato, 2) la vía glucolítica para la formación de energía, o 3) la vía de la glucogénesis para el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno.

Cuando se requiere energía, la glucosa es convertida a bióxido de carbono y agua, con la generación de energía en forma de ATP. Este proceso puede realizarse por medio de dos vías metabólicas principales: 1) la vía glucolítica o de Embden-Meyerhof y 2) la vía alterna de la lanzadera de la hexosa monofosfato (HMP). En el primer caso, la glucosa, a través de varios pasos, es rota en dos moléculas de triosa fosfato y, finalmente, a dos moléculas de piruvato. Esta conversión de la glucosa en piruvato se denomina glucólisis, proceso que se realiza en el citosol de la célula en ausencia de oxígeno (proceso anaeróbico) y rinde dos moléculas de ATP por molécula de glucosa. El piruvato obtenido puede, bajo condiciones anaeróbicas, ser reconvertido en glucosa-6-fosfato (por una vía diferente) o ser convertido, por acción de la enzima lactado deshidrogenasa, en lactato. Bajo condiciones aeróbicas, el piruvato sufre un proceso de descarboxilación oxidativa para formar acetil coenzima A (acetil CoA).

A través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), también llamado ciclo de Krebs o del ácido cítrico (proceso que ocurre dentro de la mitocondria y que consiste en una serie de reacciones de óxido-reducción), el acetil CoA es degradado a bióxido de carbono y agua, con la producción de 24 moléculas de ATP (12 por molécula de acetil CoA) por el acoplamiento de la oxidación de la glucosa con la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La oxidación completa de una molécula de glucosa genera un total de 38 moléculas de ATP (2 directamente de la glucólisis, 2 directamente del TCA y el resto por la oxidación de las moléculas de NADH y FADH₂ producidas durante todo el proceso).

La cantidad de ATP producido varía según el tejido donde se realice la oxidación de la glucosa; en el músculo y el cerebro se producen 36 moléculas, mientras que en el hígado, el corazón y el riñón se producen 38. Esto es debido al uso selectivo de dos mecanismos diferentes para transportar las moléculas de NADH producidas durante la glucólisis anaeróbica, desde el citosol hacia la mitocondria.

La oxidación alternativa de la glucosa por medio de la vía de la vía de la hexosa monofosfato, convierte a la glucosa-6-fosfato en ribosa-5-fosfato con la producción de dinucleótido fosfato de

nicotinamida y adenina (NADPH), el cual es un potente reductor y es fuente importante de energía para muchos procesos metabólicos, entre ellos la síntesis de ácidos grasos y esteroides. Esta vía es también importante para la glucólisis en los glóbulos rojos, ya que ellos, al carecer de mitocondrias, no pueden desarrollar la fosforilación oxidativa en el ciclo de Krebs.

Si el organismo no requiere de glucosa como fuente inmediata de energía, ésta es almacenada en el hígado en forma de glucógeno, por medio del proceso denominado glucogénesis. El proceso inverso, la glucogenólisis, es útil para regular los niveles séricos de glucosa cuando éstos disminuyen.

Otra vía metabólica importante en la regulación de los niveles sanguíneos de glucosa es la gluconeogénesis, especialmente durante el ayuno prolongado; la cual consiste en la formación de glucosa a partir de fuentes distintas a los carbohidratos, tales como los aminoácidos, ácido láctico o la fracción glicerol de los ácidos grasos.

Bajo condiciones ordinarias, los niveles sanguíneos de glucosa sanguínea permanecen considerablemente constantes. Durante un ayuno breve, la caída de los niveles séricos puede ser evitada por la formación de glucosa a partir de la glucogenólisis; mientras que durante un ayuno prolongado cobra importancia la gluconeogénesis como fuente de glucosa. Cuando los niveles séricos aumentan, la glucogenólisis es reemplazada por la glucogénesis.

Estas vías están sujetas a delicados mecanismos de control, como la inhibición por retroalimentación y el control hormonal, lo que ayuda a mantener los niveles séricos de glucosa dentro de un rango reducido, a pesar de los cambios en la alimentación y el ayuno.

Las hormonas que juegan un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa son la insulina, el glucagón, la epinefrina, la tiroxina (T4), la hormona del crecimiento (GH), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), el cortisol, la somatostatina y las somatomedinas.

Los desórdenes en el metabolismo de los carbohidratos pueden reflejarse en el incremento de los niveles plasmáticos de glucosa (hiperglicemia), disminución en la concentración plasmática de glucosa (hipoglicemia) o en concentraciones plasmáticas bajas o normales, acompañadas de la excreción de azúcares no reductores por la orina (errores innatos del metabolismo de los carbohidratos). Con mucho el desorden más frecuente es la hiperglicemia, siendo la diabetes mellitus la enfermedad más frecuentemente asociada a ella.

La determinación de los niveles séricos de glucosa es importante para hacer el diagnóstico de diabetes mellitus (para proporcionar el tratamiento apropiado) y controlar los niveles séricos de este monosacárido en pacientes ya diagnosticados, ya que la hiperglicemia característica en estos pacientes puede resultar en una de sus principales complicaciones: la cetoacidosis. Por otro lado, el paciente diabético insulino dependiente, si no hay un control estricto sobre la medicación, pueden sufrir episodios hipoglicémicos (glucosa sérica por debajo de los 50 mg/dl) que comprometan seriamente su salud, incluso provocándoles la muerte.

Las pruebas que son útiles para establecer el diagnóstico y realizar un monitoreo apropiado son: glucosa plasmática al azar, glucosa plasmática en ayunas, glucosa urinaria, glucosa plasmática dos horas post prandial, curva de tolerancia a la glucosa, determinación de la hemoglobina glucosilada, determinación de fructosa, auto monitoreo de los niveles de glucosa sanguínea por glucómetro, prueba de microalbuminuria y prueba de cuerpos cetónicos urinarios. En un paciente diabético controlado la concentración de glucosa sérica en ayunas deberá estar por debajo de los 100 mg/dl y la de dos horas pos prandial por debajo de 140 mg/dl. Por su parte, el test de glucosa urinaria deberá ser negativo, ya que la glucosa aparece en orina cuando los niveles de glucosa sérica están por arriba de 160

mg/dl o 180 mg/dl. La hemoglobina glucosilada (también llamada Hb A1c) refleja, en forma indirecta, la concentración promedio de glucosa sanguínea en los últimos dos meses, por lo que su medición es útil para determinar si un paciente ha estado cumpliendo con la terapia y el grado en el que el control de la diabetes ha sido satisfactorio. Los valores normales de Hb A1c están entre 3.0 y 6.0 %, mientras que en un paciente diabético se consideran satisfactorios valores por debajo de 7 %.

FUNDAMENTO METODOLÓGICO DE LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA SÉRICA

Existen muchos procedimientos técnicos para la determinación de la glucosa en suero, sin embargo, actualmente, se utilizan los métodos enzimáticos debido a su alto grado de especificidad, su simplicidad y la rapidez de su ejecución. De estos métodos hay dos comúnmente utilizados: el de la glucosa oxidasa y de la hexocinasa; de los cuales, el segundo es considerado como el de referencia.

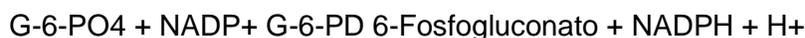
a. Método de la hexocinasa (HK)

Este método involucra dos reacciones copuladas:

1. En la primera reacción, la enzima hexocinasa (HK), en presencia de iones Mg^{++} , cataliza fosforilación de la glucosa por el adenosin trifosfato (ATP) para formar glucosa-6-fosfato (G-6-PO₄) y adenosin difosfato (ADP):



2. En la segunda reacción, la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) cataliza la oxidación de la G-6-PO₄ por la nicotinamida dinucleótido fosfato (NADP⁺) para producir fosfogluconato, NADPH y H⁺:



La formación de NADPH incrementa la absorción de luz, la que es medida a 340 nm y es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra; es decir, que a mayor absorción de luz (absorbancia) mayor es la concentración de glucosa. Si la G-6-PD se obtiene de levaduras, el cofactor utilizado es la NADP⁺, pero si su fuente es la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* se utiliza el NAD⁺.

a.1 Interferencias

El método de referencia recomienda el uso de suero o plasma libre de proteínas, sin embargo, debido al tiempo consumido en el proceso de desproteinización, se puede utilizar un blanco de muestra (agua más suero o plasma) para corregir la interferencia por sustancias que absorben luz a 340 nm. Para ahorrar tiempo, muchos laboratorios no corren el blanco, por lo que se obtienen valores de glucosa ligeramente más altos.

Las especificidades combinadas de la hexocinasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa limitan la interferencia por otros carbohidratos. La hexocinasa también fosforila a la manosa y la fructosa, pero estos azúcares no están presentes en cantidades importantes en el suero como para causar interferencia.

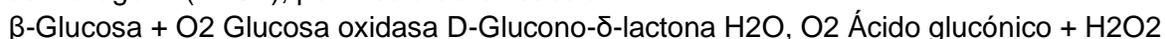
La hemólisis interfiere con el método de la hexocinasa debido a que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de los eritrocitos utilizan el NADP⁺ como sustrato.

Muchos métodos actuales utilizan enzimas bacterianas para reducir la interferencia por hemólisis. En el procedimiento puede utilizarse ya sea suero o plasma. En relación a este último, anticoagulantes como fluoruro de sodio, heparina, EDTA y oxalato no interfieren con este método; sin embargo, en caso de hemólisis o ictericia intensa y muestras turbias (por lipemia), se requiere del uso del blanco de muestra, frecuentemente omitido, para eliminar la interferencia. La principal desventaja del método es el alto costo de la enzima.

Este método también puede acoplarse a un indicador de la reacción utilizando metosulfato de fenazina (PMS) y una sal de iodonitrotetrazolio (INT), de tal manera que la absorbancia de luz puede ser medida en el rango visible. En este caso, el INT es reducido por la NADPH para formar un producto coloreado cuya máxima absorbancia es a 520 nm.

b. Método de la glucosa oxidasa

En este método la enzima glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), por medio de la reacción:



La glucosa oxidasa es altamente específica para la β -D-Glucosa. Como una solución de glucosa en equilibrio contiene casi una tercera parte de α -D-Glucosa y dos terceras partes de β -D-Glucosa, es importante que, en este método, el estándar utilizado permanezca en reposo por lo menos 2 horas, previo su uso, para permitir que alcance el equilibrio. Como la β -D-Glucosa es oxidada por la glucosa oxidasa, la α -D-Glucosa es convertida a la forma β por la ley de acción de masas. Las preparaciones de glucosa oxidasa algunas veces contienen la enzima mutarotasa, lo que evita este proceso. Esta precaución no es necesaria con el método de la hexocinasa. La concentración de glucosa es proporcional al H₂O₂ producido a al oxígeno consumido, de tal manera que ambos se miden para determinar la concentración de glucosa en la muestra.

El H₂O₂ puede ser medido acoplándolo a una reacción indicadora (utilizando un cromógeno reducido) catalizada por la enzima peroxidasa:



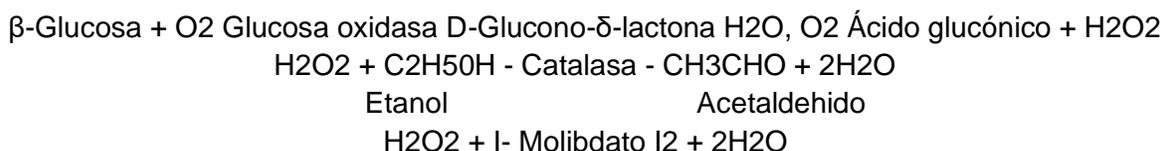
En esta reacción, la peroxidasa cataliza la oxidación de un cromógeno aceptor de oxígeno, tal como la ortodiansidina, para formar un producto coloreado (cromógeno oxidado) que puede ser medido fotométricamente.

1 Interferencias

La reacción de la peroxidasa es menos específica que la de la glucosa oxidasa, por lo que varias sustancias reductoras presentes en suero, tales como el ácido úrico, el ácido ascórbico, la bilirrubina y el glutatión, pueden inhibir la reacción compitiendo con el cromógeno por el H₂O₂; esto causa resultados falsamente bajos. Otros colorantes tales como, la 3-metil-2-benzotiazolona (MBTH) acoplada oxidativamente con la N,N-dimetilanilina (DMA), conocido como método de Gochman, o la 4-aminofenazona acoplada oxidativamente con el fenol, conocido como método de Trinder, están sujetos a menos interferencias por concentraciones altas de creatinina, ácido úrico o hemoglobina. También pueden obtenerse resultados bajos si la preparación de glucosa oxidasa está contaminada con la enzima catalasa, debido a que esta enzima descompone el H₂O₂. La principal ventaja del método de la glucosa oxidasa es su bajo costo.

Existen muchos dispositivos hogareños de monitoreo del nivel de glucosa que dependen de la reacción cromogénica de la glucosa oxidasa. En estos métodos, una pequeña superficie de una tira reactiva es impregnada con unamezcla seca de los reactivos. Se coloca una gota de sangre sobre la "almohadilla" de reactivos, se lava o se limpia, y la tira es leída en un colorímetro de reflectancia o comparada con una tarjeta de colores. Los resultados obtenidos con estos dispositivos son alrededor del 10% más bajos que los obtenidos con plasma o suero, principalmente debido al contenido en agua entre los dos tipos de muestras. Los resultados confiables se obtienen solamente si se siguen en forma precisa las instrucciones.

Las interferencias encontradas en el paso de la peroxidasa, en el método de glucosa oxidasa, pueden ser eliminadas midiendo la proporción de oxígeno consumido. Algunos instrumentos utilizan un electrodo de oxígeno polarográfico que mide la proporción de oxígeno consumido después de la adición de muestra a una solución que contenga glucosa oxidasa. El H₂O₂ generado es removido por reacción con etanol o ioduro para prevenir la reversión de la reacción:



Las últimas dos reacciones son necesarias para prevenir la formación de O₂ a partir del H₂O₂ por la catalasa, la cual está presente como un contaminante en algunas preparaciones de glucosa oxidasa. No debiera utilizarse sangre completa porque los eritrocitos consumen oxígeno. Este método es preciso, linear, libre de interferencias y se correlaciona bien con el método de la hexocinasa.

El método de electrodo de oxígeno polarográfico originalmente estuvo disponible para los laboratorios en una forma manual o semiautomatizada como el Analizador de Glucosa Beckman. Éste es la base de los instrumentos automatizados de la serie CX (CX-3, CX-7, CX-9) de Beckman (Beckman Coulter Inc., Brea, CA). Una variación sobre éste método es el Analizador Clínico Portátil i-STAT (i-STAT Corporation, Princeton, NJ), el cual mide amperométricamente el H₂O₂ producido.

Los rangos de referencia para la glucosa en ayunas (10 a 16 horas), determinados por métodos enzimáticos específicos, se listan en la tabla de abajo. No hay gran diferencia en los rangos, y los rangos establecidos para adultos son aplicables a niños después de las primeras cinco semanas de vida. Los valores de glucosa plasmática en ayunas se incrementan alrededor de 2 mg/dl por década en un adulto y entre 8 a 13 mg/dl por década luego de una carga de glucosa.

Los valores en líquido cefalorraquídeo (LCR) son usualmente alrededor del 60 al 75% de los valores plasmáticos y deben ser comparados con los valores en plasma para una adecuada interpretación clínica.

Los niveles de glucosa en orina se miden en muestras recolectadas en un tiempo determinado, más que en una muestra al azar, y es menor de 0.5 g/día.

Muestra	mg/dl	mmol/L
Suero o plasma	70-100	3.9-5.8
Sangre completa	65-90	3.6-5.3
Neonato a término	30-60	1.7-3.3
LCR	40-70	2.2-3.9
Orina al azar	< 30	< 1.7

Rangos de referencia para glucosa en ayunas

OBJETIVOS

1. Comprender la importancia que los carbohidratos tienen para el organismo
2. Conocer el proceso de digestión de los carbohidratos
3. Comprender los mecanismos de regulación del metabolismo de la glucosa
4. Conocer los resultados de la deficiencia en el metabolismo de los carbohidratos
5. Familiarizarse con los procedimientos utilizados para el diagnóstico de la diabetes mellitus
6. Familiarizarse con los procedimientos utilizados para la determinación de glucosa sérica

MATERIALES Y EQUIPO

1. Fotómetro con selección de longitud de onda de 545-550 nm
2. Pipetas automáticas de 5-50 μ L, 50-250 μ L y 200-1000 μ L
3. Puntas para pipeta color amarillo y azul
4. Tubos de ensayo
5. Gradillas
6. Reactivo para la determinación de glucosa sérica
7. Solución estándar de glucosa de concentración 100 mg/dl
8. Sueros de pacientes
9. Guantes de latex
10. Papel absorbente
11. Recipientes para la disposición de material contaminado
12. Recipiente para colección segura de desechos

PROCEDIMIENTO

1. Preparar todo el material que será utilizado en la práctica
2. Rotular tres tubos, de la siguiente manera, escribiendo sólo la o las letras resaltadas y no lo que está dentro del paréntesis. En el caso de la muestra, debe escribirse la identificación que le dé a su muestra:
 - a. Uno como **B** (blanco)
 - b. Uno como **St** (estándar)
 - c. Uno como **Mx**(muestra)
3. Dispensar en cada tubo 500 μ L de reactivo para la determinación de glucosa
4. Al tubo **St** agregarle 5 μ L de solución estándar de glucosa y mezclar suavemente
5. Al tubo de muestra agregarle 5 μ L de suero del paciente y mezclar suavemente
6. Incubar los tres tubos por 5 minutos a 37°C.
7. Seleccionar en el fotómetro 500 nm de longitud de onda

8. Lectura de absorbancias

- 8.1. Trasvasar a la cubeta de lectura el contenido del tubo **B** (blanco de reactivo)
- 8.2. Limpiar la cubeta con papel higiénico
- 8.3. Poner en cero el fotómetro introduciendo la cubeta de lectura en el portacubetas del fotómetro **(la lectura de absorbancia que se muestre en la pantalla no deberá anotarse, ya que sólo será utilizada por el fotómetro para corregir la absorbancia del estándar y la muestra)**
- 8.4. Descartar el contenido de la cubeta en el recipiente para desechos líquidos y eliminar el remanente golpeando la boca de la cubeta sobre papel absorbente
- 8.5. Trasvasar el contenido del tubo **ST** a la cubeta
- 8.6. Limpiar la cubeta con papel higiénico
- 8.7. Leer la absorbancia del estándar introduciendo la cubeta de lectura en el porta cubetas del fotómetro y anotar la lectura de la pantalla como **ASt** (absorbancia del estándar)
- 8.8. Repetir el paso 8.4
- 8.9. Repetir los pasos del **8.5 al 8.7, utilizando en esta ocasión el contenido del tubo de muestra** y anotando el valor numérico de la pantalla como **AM** (absorbancia de la muestra)
- 8.10. Descartar el contenido de la cubeta en el recipiente para desechos líquidos
- 8.11. Lavar la cubeta por lo menos dos veces con agua desmineralizada
- 8.12. Descartar el remanente de agua golpeando varias veces la boca de la cubeta sobre papel absorbente
- 8.13. Dejar la cubeta boca abajo sobre el papel absorbente

9. Cálculo de la concentración de glucosa en la muestra

- 9.1. Para calcular la concentración de glucosa utilice la ecuación de Beer-Lambert:

$$\text{Concentración en la muestra} = AM / ASt \times \text{Concentración del estándar}$$

- 9.2. Registrar el resultado de la concentración como mg/dl de glucosa

RESULTADOS

1. Presentar el resultado obtenido, dejando constancia de todo lo realizado (operaciones matemáticas)

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Para analizar y discutir los resultados, busque los valores normales de glucosa en el inserto del reactivo y responda en forma extendida la siguiente pregunta:
 - a. Considerando que las muestras trabajadas fueron obtenidas en ayunas, ¿qué riesgo tienen los pacientes de padecer diabetes?

CUESTIONARIO

1. Describir en forma detallada el proceso de digestión de los carbohidratos de la dieta
2. ¿Qué tipos de diabetes existen?
3. En cuanto a las causas, ¿qué diferencia hay entre los dos tipos de diabetes más importantes?
4. En relación a la pregunta anterior:
 - a. ¿Cómo se hace el diagnóstico en cada una de ellas? Clínico y por laboratorio.
 - b. ¿Cómo se manifiestan los siguientes cambios metabólicos en cada una de ellas?
 - i. Hiperglucemia
 - ii. Cetoacidosis

iii. Dislipidemia

- c. ¿Cuál es el tratamiento en cada caso?
5. ¿Cuáles son los criterios de la Asociación Americana de la Diabetes para establecer el diagnóstico de diabetes mellitus?
6. ¿Cómo actúan las hormonas que regulan el metabolismo de la glucosa?
7. ¿En qué consiste el fenómeno de la resistencia a la insulina?
8. ¿Qué pruebas de laboratorio son útiles para monitorear el manejo de pacientes ya diagnosticados como diabéticos?
9. ¿Cuál es la interpretación de estas pruebas?
10. ¿Cuáles son y cómo pueden prevenirse los efectos crónicos de la diabetes?
11. ¿Cuál es el principio del método utilizado en esta práctica?

BIBLIOGRAFÍA

Haga un listado de los libros de texto o artículos de revistas reconocidas consultados para la realización del informe de la práctica, indicando el número de las páginas consultadas.