

Un método sencillo para la determinación cuantitativa del glucógeno en los tejidos

POR

A. PI SUÑER

Nuestros experimentos sobre sensibilidad trófica hacían necesario un método que permitiera medir con seguridad y comodidad la cantidad de glucógeno contenido en el hígado.

El procedimiento de Pflüger (1), el más generalmente utilizado, da resultados excelentes, pero es más largo, complicado y costoso que el nuestro. Consiste, como es sabido, en digerir el tejido en lejía de potasa al 60 por 100 y precipitar el glucógeno por medio del alcohol fuerte.

Posteriormente Bierry y Gruzewska (2) han recomendado una técnica más complicada: tratamiento por la potasa al 35 por 100 a 120° durante 30 minutos, neutralización por el clorhídrico, precipitación de los proteicos por el nitrato mercúrico, hidrólisis por el ClH a 120° durante media hora y determinación de la cantidad de glucosa resultante por el método de Bertrand. Los otros métodos de separación de los proteicos hepáticos, incluyendo en ellos el procedimiento de Brücke y Kulz no son tampoco lo suficientemente seguros y sencillos (3).

Nosotros hemos llegado a un procedimiento de una extrema sencillez y que nos ha dado los mejores resultados; la cocción del hígado muy dividido en pequeños trocitos, en solución acética al tercio por

(1) E. PFLÜGER: *Das Glycogen*, 2.^a ed., pág., 104. 1905, y *Archiv. f. d. ges. Phys.* CXIV-246. 1905.

(2) BIERRY Y GRUZEWSKA: *C. R. de l'Acad. de Scien.* CLV-1559. 1912.

(3) E. PFLÜGER: *Archiv. die ges. Phys.* CIII-169. 1904.

ciento y tratamiento consecutivo por alcohol de 96, según Pflüger. El tratamiento por el reactivo de Brücke (solución de yoduro mercúrico y yoduro potásico) recomendado por Abderhalden como coagulante de los proteicos, es, a nuestro parecer, absolutamente superfluo.

Hemos fijado la técnica como sigue: 50 c. c. de ácido acético en agua destilada a 0'33 por 100, casi a la temperatura de ebullición, se ponen tarados en un erlenmeyer, sobre una balanza. Se saca del animal un trozo de hígado de 5 a 10 gramos — por la costumbre se llega pronto a conocer sus dimensiones — y muy dividido, se incorpora a la solución anterior, que no debe haberse dejado enfriar, sino que tiene que mantenerse a temperatura superior a la de la inactivación de las diastasas y coagulación de los proteicos. Se pesa el hígado incorporado. Anotado el peso — la pesada debe hacerse con toda exactitud, pues es el dato que luego nos dará el tanto por ciento de glucógeno — se inicia la ebullición de la solución acética y enseguida se coloca el erlenmeyer en un baño maría anteriormente dispuesto y ya en ebullición, en el cual se deja durante un cuarto de hora. Pasado este tiempo, se decanta y se completa la trituración del hígado en un mortero con poco líquido y polvo de vidrio. El hígado ha de quedar convertido en una papilla fina; se agrega otra vez agua caliente y pasa todo de nuevo al baño maría durante una hora, asegurándose al final de que ha desaparecido todo olor a ácido acético, que, por la ebullición, se volatiliza muy pronto.

Se deja macerar durante veinticuatro horas a la temperatura del laboratorio. Después se separa el líquido por filtración (que se puede ayudar con la trompa), y se prueba si al lavar el líquido con nueva agua, se produce en ella precipitado tratándola por el alcohol y si da reacción positiva con el yodo. En general el agua del primer lavado ya no demuestra la presencia del glucógeno, pero para asegurarse de que no se escape ni la más pequeña cantidad, se lava sobre el filtro con un volumen mitad del del líquido recogido. Y así se continúa hasta agotar el glucógeno del tejido.

La solución acuosa obtenida por la filtración se trata por doble volumen de alcohol de 96 y se deja reposar 24 horas o se precipita por centrifugación. Se lava el precipitado obtenido con alcohol y éter y se mide su glucógeno, ya sea por pesada después de su desecación — lo mejor es practicar diversas pesadas a intervalos regulares, guardando el glucógeno en la estufa a 55° con sulfúrico hasta conseguir la estabilización del peso, por desecación completa — ya por polarimetría o por hidrólisis mediante el tratamiento con ClH, acidificándolo en forma que la solución de glucógeno contenga un 2'2 por 100.

Calentando la solución ácida al baño maría durante tres horas y dejándola enfriar después, se añade con una bureta la cantidad de lejía de potasa necesaria par alcalinizarla ligeramente. Se investiga ahora la proporción de glucosa por alguno de los métodos corrientes: Pflüger, Benedict, Bertrand, Carrasco.

La maceración en la solución acética arrastra el glucógeno, y sólo queda en ella como cuerpo orgánico el glucógeno, después de haber sido los proteicos coagulados por la ebullición en medio ácido. Por otra parte, el ácido acético no hidroliza el glucógeno porque es un ácido poco dissociable y que desaparece muy pronto — siendo volátil — a consecuencia de la ebullición prolongada. Mediciones comparadas de la proporción de glucógeno en una solución antes y después de hervirlo en la solución acética por nosotros empleada y en las condiciones de nuestro método, no demuestran que haya hidrolisis.

En el líquido donde se disuelve el glucógeno obtenido después de los lavados en alcohol y éter, no es posible revelar la presencia de albúminas; quedaron en el tejido coagulado y también en el alcohol de precipitación algunos amino-ácidos, demostrables por algunas reacciones coloreadas, como la de Millon. Del tejido del hígado, en cambio, ya hemos dicho que nos hemos llevado todo el glucógeno por repetidos lavados hasta la extracción completa. Determinaciones comparadas del mismo hígado sirviéndonos de nuestro método y del de Pflüger nos han dado iguales resultados.

En nuestros experimentos sobre la descarga de glucógeno por el hígado, especialmente por la ligadura de la aorta, hemos obtenido resultados satisfactorios.

Agradezco cordialmente a mi interno señor Gómez Bosch su inteligente ayuda en estos trabajos.

Nota adicional.—Hemos ensayado una mayor simplificación del método con resultados que parecen favorables.

Es maceración suficiente del hígado en agua acética caliente la de dos horas. Además separamos rápidamente el tejido hepático del líquido de maceración por centrifugación. Procedemos al lavado sobre el filtro al vacío y no precipitamos el glucógeno. Directamente se incorpora la necesaria cantidad de CIH — que resulte al 2'2 por 100 en la mezcla total — y procedemos a la hidrolisis. Ésta puede obtenerse al baño maría durante tres horas o en el autoclave a 120° durante 30 minutos. Se determina la cantidad de glucosa resultante por el Benedict: 100 gramos de glucosa corresponden a 0'927 de glucógeno.