

Técnicas para evitar la glucolisis in «vitro»

POR

J. PUCHE y J. RAVENTÓS

Con el buen deseo de eliminar cualquier causa de error que pudiese modificar los valores de glucemias en serie que realizamos con diversos fines experimentales, nos hemos visto llevados hacia esta cuestión de la glucolisis, tan debatida desde que Chauveau, en 1856, y Claudio Bernard, algún tiempo después, establecieron el hecho de la desaparición de la glucosa de la sangre «in vitro».

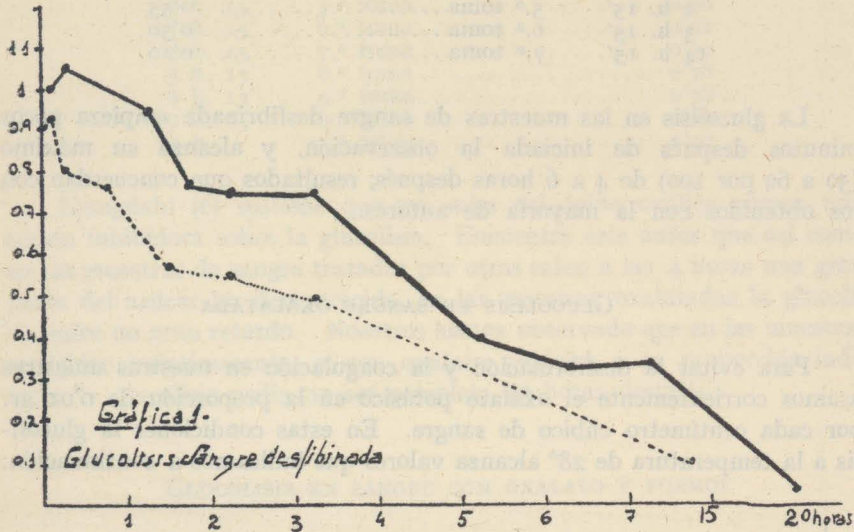
Este problema de la glucolisis «in vitro», aparte de la importancia práctica que pueda tener para valorar justamente determinadas experiencias, tiene un valor considerable desde el punto de vista teórico, ya que la solución experimental de las incógnitas que lleva aparejadas el problema, arrojaría mucha luz sobre una de las cuestiones más importantes de la fisiología de los glucidos.

Claudio Bernard (1) ve producirse la destrucción de la glucosa «in vitro» desde los 10 primeros minutos de la extracción. A las 5 horas ha desaparecido un 60 por 100 de la glucosa, y a las 24, no queda vestigio de azúcar reductor. Resultados análogos obtiene Edelmann (2) para la sangre normal. Pico, Fontana y Ameriso (17) dan valores que ascienden a un 25 por 100 de la glucosa inicial en las 5 primeras horas. Albertoni (8) obtiene cifras de un 45 por 100 a las 5 horas. Pavy y Siau (3) dan valores algo distintos a los obtenidos por los autores antes citados y por Lepine (4), no faltando autores como Spencer Melvin (5) que nieguen la existencia del fenómeno glucolítico.

Nuestras primeras experiencias fueron encaminadas a demostrar la intensidad de la glucolisis en las distintas condiciones en que colocábamos nuestras muestras de sangre.

SANGRE DESFIBRINADA

Trabajando sobre muestra de sangre desfibrinada a la temperatura de 28° se obtienen los valores que indicamos a continuación:



Experimento I

11-I-1926		1. ^a toma	I
	15'	2. ^a toma	1'07
1 h.	15'	3. ^a toma	0'95
1 h.	45'	4. ^a toma	0'76
2 h.	15'	5. ^a toma	0'75
3 h.	15'	6. ^a toma	0'75
4 h.	15'	7. ^a toma	0'54
5 h.	15'	8. ^a toma	0'40
6 h.	15'	9. ^a toma	0'32
7 h.	15'	10. ^a toma	0'35
20 h.		11. ^a toma	0'03

Experimento II

13-I-1926		1. ^a toma	0'78
	15'	2. ^a toma	0'75
	45'	3. ^a toma	0'75
1 h.	30'	4. ^a toma	0'68
2 h.	30'	5. ^a toma	0'67
3 h.	30'	6. ^a toma	0'50
4 h.	30'	7. ^a toma	0'45
24 h.	30'	8. ^a toma	0'025
41 h.		9. ^a toma	0'02

Experimento III

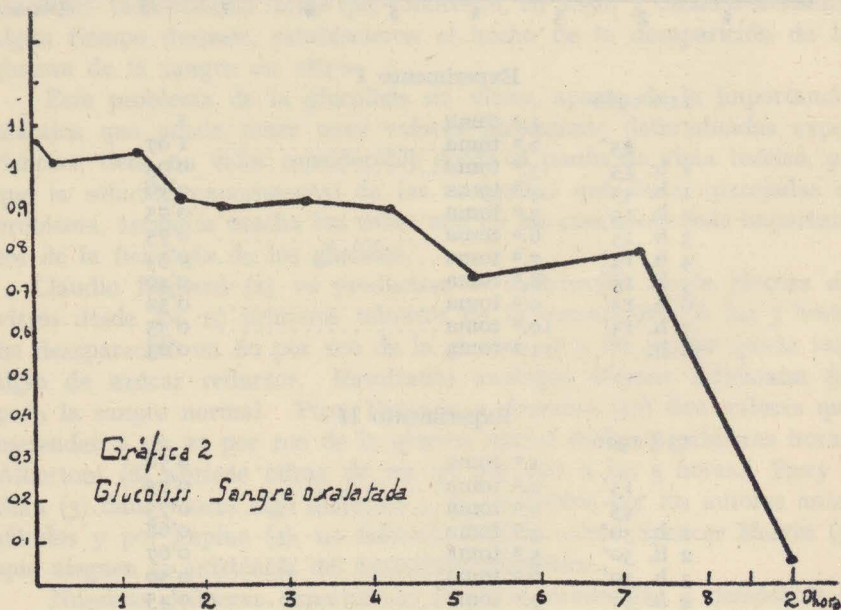
15-I-1926

	1. ^a toma	0'92
5 h. 15'	2. ^a toma	0'80
45'	3. ^a toma	0'77
1 h. 30'	4. ^a toma	0'58
2 h. 15'	5. ^a toma	0'55
3 h. 15'	6. ^a toma	0'50
14 h. 15'	7. ^a toma	0'10

La glucolisis en las muestras de sangre desfibrinada empieza pocos minutos después de iniciada la observación, y alcanza su máximo (50 a 60 por 100) de 4 a 6 horas después; resultados que concuerdan con los obtenidos con la mayoría de autores.

GLUCOLISIS EN SANGRE OXALATADA

Para evitar la desfibrinación y la coagulación en nuestras muestras usamos corrientemente el oxalato potásico en la proporción de 0'01 gr. por cada centímetro cúbico de sangre. En estas condiciones la glucolisis a la temperatura de 28° alcanza valores que indicamos a continuación:



Experimento IV

11-I-1926

	15'	1. ^a toma	1'06
1 h.	15'	2. ^a toma	1
1 h.	45'	3. ^a toma	1'05
2 h.	15'	4. ^a toma	0'92
3 h.	15'	5. ^a toma	0'90
4 h.	15'	6. ^a toma	0'92
5 h.	15'	7. ^a toma	0'90
6 h.	15'	8. ^a toma	0'78
7 h.	15'	9. ^a toma	0'78
20 h.		10. ^a toma	0'80
		11. ^a toma	0'07

Ljungdahl (6) sostiene que las sales del ácido oxálico poseen una acción inhibidora sobre la glucolisis. Encuentra este autor que así como en las muestras de sangre tratadas por otras sales, a las 4 horas una gran parte del azúcar ha desaparecido, en las muestras oxalatadas la glucolisis sufre un gran retardo. Nosotros hemos observado que en las muestras recogidas asépticamente, y con oxalato potásico a la proporción indicada, la glucolisis podía no ser completa 20 horas después.

GLUCOLISIS EN SANGRE CON OXALATO Y FORMOL

Denis y Aldrich (7) evitan la alteración química de la sangre por la adición de una gota de formaldehído por cada 10 c. c. de sangre. Utilizando esta técnica conservadora hemos obtenido los siguientes resultados:

Experimento V

11-I-1926

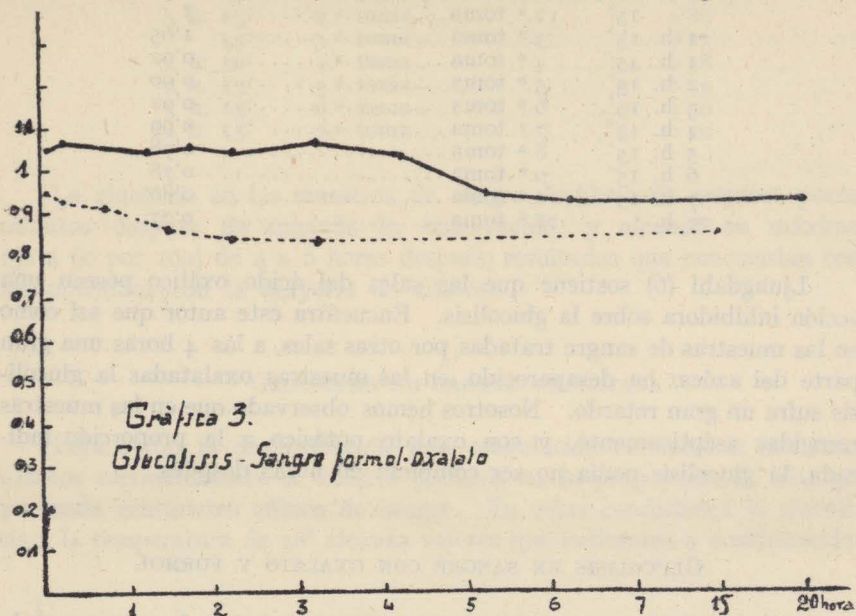
	15'	1. ^a toma	1'05
1 h.	15'	2. ^a toma	1'07
1 h.	45'	3. ^a toma	1'05
2 h.	15'	4. ^a toma	1'06
3 h.	15'	5. ^a toma	1'05
4 h.	15'	6. ^a toma	1'07
5 h.	15'	7. ^a toma	1'04
6 h.	15'	8. ^a toma	0'94
7 h.	15'	9. ^a toma	0'93
20 h.		10. ^a toma	0'92
		11. ^a toma	0'93

Experimento VI

15-I-1926

	15'	1. ^a toma	0'95
	45'	2. ^a toma	0'93
		3. ^a toma	0'90

1 h. 15'	4. ^a toma	0'86
2 h. 15'	5. ^a toma	0'83
3 h. 15'	6. ^a toma	0'84
14 h. 15'	7. ^a toma	0'85



Esta técnica tiene para nosotros el inconveniente de que haciendo tomas de sangre de unos 3 c. c., resulta difícil la adición de una cantidad adecuada de formol a cada una de las muestras. Además, a la temperatura que hemos trabajado, este método conservador no evita, de un modo absoluto, la glucolisis de las primeras horas.

GLUCOLISIS EN SANGRE CON FLUORURO SÓDICO

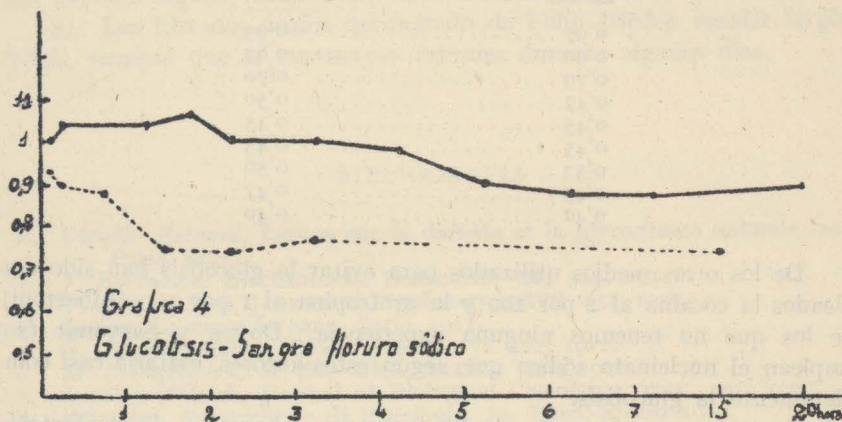
Este método, empleado por Albertoni (8), Arthus, Lepine y Boulud y por Mayor (10), lo hemos usado en algunas experiencias con los siguientes resultados:

11-I-1926			Experimento VII	
	15'		1. ^a toma	I
1 h. 15'			2. ^a toma	I'03
1 h. 45'			3. ^a toma	I'03
2 h. 15'			4. ^a toma	I'06
			5. ^a toma	I

3 h. 15'	6. ^a toma	1
4 h. 15'	7. ^a toma	0'98
5 h. 15'	8. ^a toma	0'90
6 h. 15'	9. ^a toma	0'87
7 h. 15'	10. ^a toma	0'88
20 h.	11. ^a toma	0'90

Experimento VIII

15-I-1926	1. ^a toma	0'94
15'	2. ^a toma	0'90
45'	3. ^a toma	0'88
1 h. 30'	4. ^a toma	0'75
2 h. 15'	5. ^a toma	0'75
3 h. 15'	6. ^a toma	0'77
14 h. 15'	7. ^a toma	0'75



En algunos de nuestros ensayos el fluoruro sódico, a la proporción de 1 al 2 por 100, no ha sido de una eficacia absoluta para prevenir la glucolisis 20 horas después de la extracción de la sangre.

* * *

Otros medios han sido preconizados para evitar la glucolisis; así Rona y Arnheim (11) sostienen que la hemolisis, por medio del agua destilada, evita la glucolisis, negando valor al factor leucocitario, sostenido por Lepine y Boulud (12) (13), De Meyer (14), Braunstein (15) y Arthus (16), en la producción del fenómeno, y dando un valor extraordinario al contenido de fosfatos.

El aumento de acidez, como medio de evitar la glucolisis, había sido visto por Claudio Bernard y comprobado por Rona y Wilenko (18),

los cuales han visto que un aumento de la acidez de la sangre es desfavorable a la glucolisis. Cuando $[H^+]$ es igual a $2-3 \times 10^{-7}$, la glucolisis es debilitada y al llegar a $[H^+]$ $4-6 \times 10^{-7}$, se inhibe en absoluto. Mauriac y Servantie dan como reacción actual óptima, para que se produzca la glucolisis, un valor de $P_H = 8$.

La eficacia del medio ácido para evitar la glucolisis se pone bien de manifiesto en los filtrados del método de Folin y Wu para la dosificación de la glucosa, como puede verse en los datos que damos a continuación:

Experimento IX

31-XII-1925

Determinaciones iniciales	A los 4 días a 28°
0'97	0'95
0'90	0'87
0'70	0'70
0'47	0'50
0'45	0'45
0'45	0'43
0'53	0'56
0'45	0'47
0'41	0'40

De los otros medios utilizados para evitar la glucolisis han sido empleados la cocaína al 1 por 100 y la urotropina al 1 por 100 (Albertoni), de los que no tenemos ninguna experiencia. Doyon y Sarvonat (20) emplean el nucleinato sódico que, según estos autores, evitaría casi completamente la glucolisis.

No vamos a entrar en esa breve nota en el estudio de los factores biológicos que explican y condicionan la glucolisis. Sólo hemos querido hacer un resumen de las técnicas usadas corrientemente para evitar este fenómeno perturbador de las experiencias dirigidas a la investigación de la glucemia.

Nuestro «modus operandi» para precavernos contra los peligros de la glucolisis es el siguiente: Hacemos las tomas de sangre con oxalato potásico al 1 por 100, manteniéndolas en la nevera a 6 u 8° hasta el término de la experiencia. Si utilizamos el método de Folin y Wu efectuamos la coagulación poco después de la toma de sangre, y en el caso de trabajar con el método de Hagedorn no estamos tranquilos sino después de haber verificado la coagulación que efectuamos en serie.

CONCLUSIONES

a) En la sangre desfibrinada a 28° la glucolisis se produce rápidamente, alcanzando un 35 por 100 a las 3 horas y un 60 por 100 a las 6 horas.

b) La glucolisis no es evitada de un modo absoluto por ninguno de los métodos empleados, por lo menos la glucolisis inicial; no así la tardía que parece ser detenida a 28° hasta más de 24 horas.

c) El uso del fluoruro sódico parece ser bastante eficaz, así como el oxalato potásico a la misma proporción, no encontrando adecuado para nuestros objetos el empleo del formol.

d) Las variaciones del P_H. y del contenido salino de la sangre pueden explicar algunas variaciones en la intensidad de la glucolisis.

e) Los filtrados ácidos del método de Folin pueden resistir la glucolisis, siempre que se mantengan estériles durante algunos días.

BIBLIOGRAFÍA

1. *Claudio Bernard*, Leçons sur la diabète et la glycogenese animale, 207. Paris, 1877.
2. *J. Edelmann*, Biochemische Zeitschrift, XL, 314; 1912.
3. *F. Pavy et Siau*, Journal of Physiology, XXVII, 451; 1902.
4. *Lepine*, Le sucre du sang. Paris, 1921.
5. *G. Spencer Melvin*, Bioch. Journal, VI, 422; 1912.
6. *M. Ljungdahl*, C. R. Soc. Biol., LXXXVI, 498; 1922.
7. *Denis y Aldrich*, Journal of Biological Chemistry, XLIV, 203; 1920.
8. *Albertoni, P.*, Archivio di Fisiologia, 20. Enero-marzo 1925.
9. *R. Lepine y Boulud*, Sur le sucre virtuel du sang. Comunicación al sexto Congreso Internacional de Fisiología; 1904.
10. *Mayor, R. M.*, Journal of American Med. Assoc., LXXXI, 1952; 1923.
11. *P. Rona-F. Arnheim*, Biochemische Zeitschrift, XLVIII, 35; 1913.
12. *Lepine y Boulud*, C. R. Soc. Biol., LXXII, 1064; 1912.
13. *R. Lepine et Boulud*, C. R. Soc. Biol., LX, 805; 1906.
14. *J. de Meyer*, Arch. Inter. de Physiologie, II, 131; 1905.
15. *A. Braunstein*, Zeitschrift. für allgemeine Physiologie.
16. *Arthus*. Citado por Albertoni y por Lepine.
17. *O. Pico-H. Fontana y J. Ameriso*, Rev. de la Soc. Argentina de Biología, I, 199; 25-X-1924.
18. *P. Rona-G. Wilenko*, Biochemische Zeitschrift, LXII, 1; 1914.
19. *P. Mauriac, L. Servantie*, C. R. Soc. Biol., LXXXVII, 200; 1922.
20. *M. Doyon, F. Sarvonat*, C. R. Soc. Biol., LXXIV, 569; 1913.

Comunicación leída en la «Societat de Biología de Barcelona». 26-I-1926.