

Simplificación de la técnica de Pi Suñer para la determinación del glucógeno en los tejidos

POR

A. PI SUÑER Y R. CARRASCO FORMIGUERA

La experiencia adquirida con el uso del método para la determinación cuantitativa del glucógeno en los tejidos, que uno de nosotros describió anteriormente, nos ha llevado a introducir algunas modificaciones que lo hacen todavía más sencillo sin perder su precisión.

La técnica, tal como la practicamos actualmente, es la siguiente: Se ponen 30 c. c. de agua destilada en un matraz de boca ancha, de unos 150 c. c. al baño de maría. Se extrae del animal un pedazo de hígado de 5 a 10 gramos; se tritura rápidamente; se pesa cuidadosamente en una balanza que aprecie bien 0'05 gramos, y se echa en el matraz que está al baño maría; se agita de cuando en cuando con una varilla de vidrio, o agitando el matraz, y al cabo de un cuarto de hora, aproximadamente, se decanta incompletamente el líquido, recogiendo en un matraz aforado de 100 c. c.; se decanta la cantidad que buenamente pueda separarse (sin que se arrastren partículas de tejido), y se vacía lo que queda en el matraz (fragmentos de tejido y una cierta cantidad de líquido) dentro de un mortero bien limpio y seco; se le añaden unos cinco gramos de arena fina lavada y se tritura con la mano del mortero hasta obtener una pasta fina; esta pasta se vuelve a poner dentro del mismo matraz, lavando el mortero tres veces con agua destilada (50 c. c. entre los tres lavados); la reincorporación del tejido al matraz es necesario que sea total, como para un análisis cuantitativo; se deja el matraz al baño maría durante me-

dia hora, agitando de cuando en cuando; pasado este tiempo se pasa el contenido del matraz a tubos de centrifugador y se centrifuga enérgicamente durante cinco minutos. Mientras tanto en el matraz que se ha vaciado, en el cual quedan siempre algunas porciones de tejido y arena, se ponen 20 c. c. de agua destilada que se hacen calentar al baño maría; una vez terminada la centrifugación, se aspira el líquido y se le adiciona al líquido recogido en la decantación anterior; en seguida se retira del baño maría el matraz que contiene los 20 c. c. de agua, se agita de manera que esta agua lave las paredes del matraz, y, después de asegurarse de que la temperatura del agua, aun siendo elevada, no lo es lo bastante para romper los tubos del centrifugador, se añade esta agua al sedimento que ha quedado como efecto de la centrifugación. Se agita muy bien con una varilla de vidrio y se centrifuga nuevamente durante cinco minutos (para equilibrar el peso de los tubos añadimos arena fina al que pesa menos); se aspira el líquido y se incorpora al recogido anteriormente, alcanzando todo, en conjunto, un poco menos de 100 c. c.; se añade 0,5 c. c. de ácido acético cristalizable y se completa con agua destilada hasta 100 c. c. Este líquido contiene todo el glucógeno del pedazo de hígado que se ha tomado, diluido en 100 c. c. de líquido. El mismo matraz aforado se pone al baño maría durante tres minutos, con lo que se precipitan las substancias proteicas que todavía quedaban disueltas; se filtra, se deja o se hace enfriar hasta llegar a la temperatura del laboratorio y del filtrado se toman entonces exactamente 80 c. c., que se ponen dentro de un matraz aforado de 100 c. c.; se añaden 5 c. c. de ácido clorhídrico concentrado (22° B.) y se completa hasta 100 c. c.; entonces se pone este líquido en un matraz de unos 150 c. c., se pone un refrigerante de reflujo y se lleva al baño maría donde se deja durante tres horas. Pasado este tiempo, se saca del baño maría y se deja o se hace enfriar, se toman exactamente 50 c. c. del líquido frío y se le añaden, poco a poco, 40 c. c. de solución saturada de carbonato sódico; en la mezcla resultante se tiene exactamente el 40 % del glucógeno del trozo de hígado que se ha tomado, convertido en glucosa y disuelto en un volumen de 80 c. c., disolución equivalente a la del 50 % del glucógeno en 100 c. c. Se hace la dosificación de la glucosa contenida en esta solución por algún método exacto; el tanto por ciento obtenido para este líquido, multiplicado por 200, nos da la cantidad de glucógeno contenida en el trozo de hígado que se ha tomado expresado en glucosa, y conocida esta cifra, del peso de este trozo de hígado se deduce el tanto por ciento de glucógeno expresado en

glucosa; la cifra de glucosa, multiplicada por 0'927, da la cifra de glucógeno.

Este proceso, que en conjunto dura menos de cinco horas, puede ser interrumpido las horas que convenga (siempre menos de veinticuatro horas en cada interrupción) en los momentos siguientes. Primero, después que el tejido triturado con arena, hasta llegar a convertirse en pasta, ha estado media hora en maceración al baño maría, y antes de la primera centrifugación. Segundo, después de la segunda centrifugación, cuando se ha incorporado la última porción de líquido a las dos porciones procedentes de la decantación y la primera centrifugación, y antes de añadir el ácido acético. Tercero, después de filtrar y antes de añadir el ácido clorhídrico. Cuarto, después de las tres horas de hidrolisis y antes de añadir el carbonato sódico.

Con esta técnica obtenemos resultados constantes y absolutamente coincidentes con los de la técnica de Pi Suñer primitiva y con los del método de Pflüger; esta coincidencia la hemos comprobado con numerosas determinaciones de control, de cuyos resultados son ejemplos las siguientes cifras.

1.º Valores obtenidos por el método nuevo con dos fragmentos próximos de hígado extraídos simultáneamente.

Primer fragmento.	4,75 por 100
Segundo fragmento.	4,71 por 100

2.º Valores obtenidos con dos fragmentos próximos de hígado extraídos simultáneamente y examinados uno por el método antiguo, y el otro por el método nuevo.

Primer fragmento (método antiguo).	3,28 por 100
Segundo fragmento (método nuevo).	3,30 por 100

3.º Valores obtenidos con dos fragmentos próximos de hígado extraídos simultáneamente, examinados uno por nuestro método (nuevo) y el otro por el método de Pflüger.

Primer fragmento (método nuestro nuevo).	5,30 por 100
Segundo fragmento (método de Pflüger).	5,29 por 100

La técnica que descubrimos ofrece sobre la de Pflüger las ventajas de ser mucho más breve, tener menos manipulaciones expuestas

a producir errores por pérdida de substancia (pérdida, por decirlo así, mecánica, y pérdida química por glucogenolisis) y ser muchísimo más económica (ahorro de potasa cáustica y de alcohol). Tiene solamente la desventaja de valorar junto con el glucógeno, los hidratos de carbono de molécula más sencilla que haya en el tejido. Esto, en la mayoría de los casos, no es ningún inconveniente. Cuando lo sea, a partir del momento en que se ha filtrado la solución de glucógeno, se procede según la técnica antigua.

Si en vez de determinar el glucógeno del hígado se investiga en otro tejido más pobre en glucógeno, conviene tomar mayor cantidad de tejido para la misma cantidad de agua.

Publicado en el octavo volumen de TREBALLS
DE LA SOCIETAT DE BIOLOGIA, 1920-21, pág. 123.