

Universidad Autónoma de Querétaro

RELACIONES ENTRE EL METABOLISMO DEL CALCIO Y EL FOSFORO Y EL EQUILIBRIO ACIDO BASE INFLUENCIA DE LA DIABETES ALOXANICA EN PERROS

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a:

BENJAMIN URBIOLA BASALDUA .

Biblioteca Central
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

Querétaro, Querétaro.

1 9 6 3

No. Reg. H53614

.. TS

Clas. 591.2

U738

Noviembre de 1963

El presente trabajo, fué realizado en el Departamento de Ciencias Básicas (Bioquímica) de la Escuela Nal. de Odontología bajo la Dirección del Dr. Federico -- Fernández Gavarrón

Ciudad Universitaria México

*Gracias Dios mio
por tantos Beneficios*

*A mis queridos padres
Sr. José Urbiola U.
Sra. Clementina B. de Urbiola
con el deseo de honrar sus nombres
y el agradecimiento de toda mi vida.*

A mis hermanos

Al Rector de la Universidad Autónoma de Querétaro
Sr. Lic. Fernando Diaz Ramírez

A los Maestros
de mi escuela de Ciencias Químicas

A mis amigos y compañeros

Con profundo reconocimiento agradezco
a mi asesor técnico y maestro

Q. B. P. Federico Fernández Gavarrón

su inestimable dirección y estímulo en la
realización de esta tesis

Contenido :

- 1.- Introducción
- 2.- Material y métodos
- 3.- Resultados
- 4.- Discusión
- 5.- Resumen
- 6.- Referencias

I N T R O D U C C I O N

Se considera como normal, una variación en el pH sanguíneo de 7.3 a 7.5 ; estos límites son aparentemente estrechos, y son mantenidos por el organismo a través de una serie de sistemas que vamos a detallar: en primer lugar, en la sangre encontramos una serie de sistemas amortiguadores, que se clasifican en 2 tipos: Inorgánicos y Orgánicos.

Entre los sistemas amortiguadores inorgánicos, nos referiremos principalmente a; $\text{HPO}_4^{=}$ / H_2PO_4^- , HCO_3^- / H_2CO_3 , K Hb / Hb H , que son los más importantes, y están manteniendo el pH sanguíneo aproximadamente entre esos límites, -- cuando se encuentran en la siguiente relación:



Existen además en el plasma, una serie de sistemas-amortiguadores, constituidos por las proteínas del plasma: $\text{Na Prot.} / \text{H Prot.}$ pero por supuesto que no todos los -- grupos disociables de las proteínas, intervienen en el mantenimiento del pH sanguíneo entre los límites antes mencionados, sino solamente aquellos grupos disociables cuyo pK , esté más ó menos próximo al pH de 7.4 que consideramos como media normal.

Pero además en sangre se encuentran los elementos -- figurados, de los cuales los más importantes para este fin son los glóbulos rojos, y en su interior contienen una cromoproteína, que es la hemoglobina; ésta tiene en su constitución un aminoácido que es la histidina, cuyo grupo imidazol tiene un pK variable, según la forma en que se encuentre la hemoglobina.

El pK de este grupo imidazol de la istidina, cuando la hemoglobina está en forma oxidada es de 6.68, y de 7.95- cuando está reducida.

Por estos valores que hemos mencionado de pK, se puede comprender que este grupo, alcanza a tener gran importancia en el mantenimiento del pH sanguíneo, entre los límites normales, puesto que estos valores están próximos al pH de 7.4 .

Para comprender bien la significación de este cambio en el pK del grupo imidazol de la istidina, vamos a efectuar los siguientes cálculos, a partir de la ecuación de -- Henderson-Hasselbach ;

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{sal}}{\text{ácido}}$$

Tomando el valor del pH constante de 7.4 , tenemos que cuando la hemoglobina está en forma oxidada, el pK del grupo imidazol es de 6.68; substituyendo estos valores en la anterior ecuación.

$$\text{pH} = 7.4 \qquad \text{pK} = 6.68$$

$$7.4 = 6.68 + \log \frac{\text{sal}}{\text{ácido}}$$

$$7.4 - 6.68 = 0.72 \quad ; \quad \text{antilog de } 0.72 = 5.25$$

$$\text{ó sea que la relación } \frac{\text{sal}}{\text{ácido}} = 5.25$$

Cuando tenemos a la hemoglobina en forma reducida, el pK del grupo imidazol es de 7.95, y efectuando la misma substitución en la ecuación de Henderson, se obtiene :

$$\text{pH} = 7.4 \quad \text{pK} = 7.95$$

$$7.40 = 7.95 + \log \frac{\text{sal}}{\text{ácido}}$$

$$\begin{aligned} \text{según la cual } 7.40 &= 7.95 - 0.55 \\ \text{antilog de } 0.55 &= 1.45 \end{aligned}$$

e igual a 0.282 ; y finalmente la relación

$$\frac{\text{sal}}{\text{ácido}} = 0.282$$

Si en el primer caso, con la hemoglobina oxidada, la relación sal / ácido, es una cifra entera y mayor que la unidad, esto quiere decir que la concentración del numerador (sal) es mayor que la del denominador (ácido) ; y cuando la hemoglobina está reducida, la cifra obtenida de la relación es de 0.282, indicando lo inverso, ó sea que la concentración del numerador es menor que la del denominador; así que podemos dividir

$$5.25 / 0.282 = 18.6$$

Lo cual quiere decir finalmente, que cuando la hemoglobina está en su forma reducida, transporta 18.6 veces -- más ácido que cuando se encuentra oxidada.

Otro papel muy importante también de este cambio de pK del grupo imidazol de la histidina, es en el transporte de CO₂ por la sangre, así, a nivel de los tejidos en los capilares arteriales, tenemos la hemoglobina en el interior -- del glóbulo rojo, disociada con carga negativa, ion HCO₃⁻ e ion Cl⁻ neutralizados por ion K⁺ . Y en el plasma existe -- ion Cl⁻ e ion HCO₃⁻ pero neutralizadas sus cargas con Na⁺ .

Como la sangre está en un intercambio activo con el plasma intersticial, y este plasma recibe sustancias de desecho de las células de los tejidos a nivel de los capilares- el plasma intersticial recibe el CO_2 de las células, y éste difunde al plasma sanguíneo, y de aquí a los glóbulos rojos.

En el interior del eritrocito, existe anhidrasa carbónica la cual cataliza la reacción del CO_2 con el agua, para formar H_2CO_3 , y al mismo tiempo se reduce la hemoglobina, de oxidada a reducida; el ácido carbónico formado por acción de la anhidrasa carbónica, se disocia en HCO_3^- e ion H^+ ; -- éste último se combina con la hemoglobina que ha sido previamente reducida, formando hemoglobina ácida (H Hb) sin disociar, debido a que el pK de la Hb reducida es mayor que el de la oxidada.

En estas condiciones, hay un exceso de ion HCO_3^- en el interior del eritrocito, y por lo tanto tiene tendencia a salir hacia el plasma sanguíneo, pero como el ion bicarbonato tiene carga negativa, para atravesar la membrana de los glóbulos rojos, es preciso que vaya acompañado de un ión -- que lo equilibre eléctricamente, pero como el ion de equilibrio que existe en el interior del glóbulo es el ion K^+ , -- que no puede atravesar la membrana, se produce un desequilibrio entre el ion bicarbonato en el interior del eritrocito y el plasma sanguíneo. Entonces el resultado es que se produce un paso de los iones Cl^- del plasma a los glóbulos, y de éstos sale ion bicarbonato, quedando así neutralizadas -- las cargas eléctricamente y balanceadas también las concentraciones de HCO_3^- tanto de los glóbulos como en el plasma.

El resultado final de este intercambio iónico es que el plasma transporta el CO_2 en forma de NaHCO_3 , sigue así recorriendo el organismo por el torrente circulatorio, y al llegar los pulmones se producen los siguientes fenómenos.

Con la mayor tensión de oxígeno que existe en los pulmones, la hemoglobina que está en forma reducida, se oxida, y al oxidarse disminuye el pK del grupo imidazol, y como estaba en forma ácida, se disocia en hemoglobina con carga negativa e ion H^+ ; éste H^+ reacciona con el HCO_3^- para formar H_2CO_3 , el cual por acción de la anhidrasa carbónica -- que existe en el interior de los glóbulos, es transformado en CO_2 y H_2O , el CO_2 pasa de los glóbulos rojos al plasma, y al llegar a los pulmones es expulsado al exterior; al producirse este fenómeno de transformación del ácido carbónico en CO_2 y H_2O , disminuye el contenido de ion HCO_3^- del plasma sanguíneo, con lo cual difunde este ion del plasma, al interior de los glóbulos, pero como el ion bicarbonato tiene que ir acompañado de un ion positivo, y el ion que se encuentra en el plasma es el Na^+ , el cual no puede atravesar la membrana de los glóbulos, entonces sale ion Cl^- del interior de éstos, y entra a cambio ion HCO_3^- del plasma, con lo cual se completa el ciclo.

Como acabamos de ver en toda la exposición anterior, el resultado final de todo este intercambio de iones, entre eritrocitos y plasma, conduce a la eliminación por vía respiratoria de CO_2 que, como sabemos, es el resultado de la descomposición del ácido carbónico; por lo tanto en esta forma el organismo está eliminando constantemente ácido a través de los pulmones; sin embargo, esta eliminación es insuficiente para liberar el total de ácidos producidos durante el metabolismo tisular, y todavía queda un residuo de ácido que tiene que ser excretado por alguna vía, la cual es la renal.

Los ácidos que son eliminados por vía renal, son -- principalmente los ácidos fijos, entre los cuales consideramos al ácido láctico, producido en la contracción muscular -- al ácido fosfórico, al sulfúrico, que se puede producir -- en el metabolismo de los aminoácidos azufrados de ciertas -- proteínas, y todos estos ácidos son eliminados a través del riñón (2).

El mecanismo por el cual se elimina este tipo de -- ácidos, es el siguiente: a nivel tisular, los ácidos fijos -- reaccionan con el ion bicarbonato contenido en el plasma intersticial, formando la sal sódica correspondiente al ácido -- y ácido carbónico; este ácido difunde a la sangre, y en -- ella es recogido y transportado hasta el riñón, el plasma -- sanguíneo se filtra totalmente en el glomérulo, formando el filtrado glomerular, cuya composición es en todo semejante -- a la del plasma sanguíneo, diferenciándose únicamente de él -- en que no contiene las proteínas del plasma sanguíneo, es decir es en realidad un ultrafiltrado del plasma, y este -- filtrado glomerular pasa por los túbulos y en ellos se reabsorben las sustancias necesarias para el organismo, por un -- proceso de reabsorción activa; es decir, en el filtrado glomerular existe $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ y $\text{NaHCO}_3 / \text{H}_2\text{CO}_3$.

La célula del túbulo hace reaccionar el Na_2HPO_4 con el ácido carbónico, transformándolo en fosfato monosódico, -- NaH_2PO_4 -- quedando el ácido carbónico como bicarbonato de sodio; este bicarbonato es reabsorbido por la célula del -- túbulo, y regresado nuevamente al torrente circulatorio, -- mientras que el NaH_2PO_4 es eliminado por la orina.

En ésta forma se elimina H^+ , lo cual le da a la orina la característica de ser capaz de eliminar grandes cantidades de ácido, sin tener un pH excesivamente ácido. El pH de la orina normal, es alrededor de 6.

Cuando este proceso de eliminación de ácido es insuficiente, la célula del túbulo es capaz de llevar a cabo -- una serie de transformaciones, principalmente a partir de -- aminoácidos, y en particular de glutamina, transformándolas en ácido glutámico y amoniaco (3) ; éste amoniaco es capaz de reaccionar con el H^+ del ácido carbónico, transformándolo en ion HCO_3^- y pasando el amoniaco a ion amonio ; nuevamente se absorbe el HCO_3^- junto con el Na^+ , eliminandose por la orina NH_4Cl , este fenómeno se produce en forma muy intensa en los casos de acidosis, en particular en el caso de la diabetes. Un diabético es capaz de eliminar cantidades relativamente grandes de ácido por la orina en forma de NH_4Cl .

Si por cualquier circunstancia, estos mecanismos de excreción de ácido, anteriormente mencionados, son insuficientes para mantener constante el pH sanguíneo y la concentración de bicarbonatos en sangre, se habla de que se ha alterado el equilibrio ácido-básico.

Estas alteraciones en el equilibrio, pueden ser fundamentalmente de 2 tipos: ACIDOSIS y ALCALOSIS (4)

Hablamos de acidosis compensada, cuando disminuye -- la concentración total de bicarbonatos en sangre (reserva alcalina) y hay un descenso proporcional del contenido de CO_2 en la misma sangre, con lo cual no hay alteración del -- pH sanguíneo.

Si la relación de ácido carbónico a ion bicarbonato que normalmente es de 1 a 20, se altera de tal manera que -- aumenta la concentración de ácido, éste fenómeno recibe el nombre de -- acidosis respiratoria -- y se debe en general, a una falta de eliminación correcta del CO_2 . Este tipo de acidosis se produce cuando se está respirando en una atmósfera cargada de CO_2 , ó hay algún trastorno de eliminación del mismo por la sangre, por ejemplo inhibición de la anhidrasa carbónica.

Cuando la relación de $\text{HCO}_3^- / \text{H}_2\text{CO}_3$ se altera, nó -- por un aumento en la cantidad de CO_2 , sino por una disminución en el contenido de HCO_3^- en sangre, se habla de una --- acidosis metabólica, esta acidosis se produce en forma normal cuando un ejercicio violento provoca una utilización -- marcada de la glucosa, con producción de gran cantidad de -- ácido láctico, el cual pasa a sangre, y al reaccionar éste- ácido con el NaHCO_3 se transforma en H_2CO_3 y lactato de sodio, y en ésta forma disminuye el contenido de bicarbonato- en sangre.

Esta alteración es rápidamente compensada por la -- eliminación de ácido por riñón, así como por hiperventila -- ción pulmonar.

Respecto a la alcalosis, podemos dividirla en las -- mismas categorías; alcalosis compensada es un aumento del -- ion bicarbonato y ácido carbónico en sangre, de tal manera, que se mantiene la relación 1 a 20 de $\text{HCO}_3^- / \text{H}_2\text{CO}_3$.

La alcalosis respiratoria ocasionada habitualmente- por aumento en la salida de CO_2 , con lo cual disminuye la -- concentración de H_2CO_3 , desequilibrando la relación en la- ecuación de Henderson contra la concentración de ácido (de nominador) , aumentando la relación de 1 a 20, y elevando -- el pH.

Como se acaba de ver en toda la exposición anterior se considera alteración del equilibrio ácido-básico, no solamente los cambios en el contenido sanguíneo, ya sea de bi carbonatos ó de CO_2 , sin embargo hay que tener en cuenta -- que para provocar esta alteración en sangre, es preciso vencer todos los mecanismos anteriormente expuestos del mantenimiento del pH sanguíneo, es decir, es necesario vencer el poder amortiguador de $\text{HCO}_3^- / \text{H}_2\text{CO}_3$; $\text{HPO}_4^- / \text{H}_2\text{PO}_4^-$; $\text{Prot}^- / \text{Prot H}^+$; de $\text{Hb}^- / \text{Hb H}$ y además vencer la excreción de ácido a través de pulmones y de riñón.

Como se comprende, no es facil que se produzcan circunstancias que sean capaces de vencer todos estos mecanismos, y sin embargo cuando se producen alteraciones en este equilibrio insuficientes para modificar la composición sanguínea, se puede apreciar facilmente en orina, porque aumenta mucho la excreción de H^+ , NH_4^+ y de $H_2PO_4^-$ en ella ; y por eso es muy importante para nosotros hacer la determinación de todas estas magnitudes en orina, para poder juzgar del estado del equilibrio ácido-base en un organismo.

Por esta razón, nos ha parecido interesante estudiar con este criterio, la diabetes aloxánica en los perros.

Sabemos (5) que la diabetes se caracteriza por una alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono, esta alteración conduce a una hiperglucemia, y como consecuencia de ella aparece glucosuria. Pero aunque esto es lo mas conocido acerca de la diabetes, podemos añadir que esta alteración no es exclusivamente en el metabolismo de los hidratos de carbono, sino tambien en el metabolismo de las grasas .

En la diabetes está alterado el metabolismo de los ácidos grasos, de tal manera que disminuye su síntesis, y se metabolizan más estos ácidos, con producción de "cuerpos cetónicos", y sabemos ademas que dichos cuerpos cetónicos (11) conducen a un estado de acidosis. Ademas, está tambien alterado el metabolismo de las proteínas con una gluconeogénesis aumentada, y excreción de amoniaco por orina.

Si relacionamos todas estas magnitudes consecuentes del estado diabético, se puede ver de inmediato que en un individuo diabético, hay una alteración del equilibrio ácido-básico, que no se manifiesta generalmente en forma importante, según los pensamientos actuales, sino hasta que se llega al final, ó sea al estado de " coma diabético " debido a la acumulación de los cuerpos cetónicos, y a una acidosis sumamente grave, de tal manera que el individuo que entra en este estado de coma, lo conduce a la muerte.

Como acabamos de ver, la acidosis se manifiesta no-
solamente por estas alteraciones en sangre, sino que se pue
de apreciar por la excreción de fosforo, ion hidrógeno e --
ion amonio en orina, y como por otra parte Fdez. Gavarrón y
Bernal(6) han demostrado que el metabolismo del calcio y el
fosforo están sumamente influenciados por el equilibrio áci
do-básico.

Cuando se estudia la alteración en éste equilibrio,
por inyección de soluciones ácidas ó alcalinas, hemos consi
derado conveniente estudiar si las alteraciones en este equi
librio producidas por trastornos metabólicos, influyen en -
forma semejante a la estudiada por Ellos en condiciones muy
distintas.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Este trabajo se llevó a cabo utilizando 2 perros, de 14 y 16 Kgs. a los cuales se colocó individualmente en jaulas metabólicas, se les efectuó en orina, y como control -- inicial las determinaciones de:

- a) Volumen
- b) Acidez titulable
- c) Calcio
- d) Fosforo
- e) Amoniaco

En la tabla No. 1 se indican los promedios y desviaciones estándar de estas determinaciones, efectuadas durante 15 días, despues de los cuales se les hizo diabéticos mediante la inyección por vía intravenosa de 900 mg. de Aloxana a cada animal. Y se continuaron efectuando las determinaciones antes mencionadas.

DETERMINACION DE VOLUMEN

La orina era recibida en frascos colocados bajo las jaulas, y medido su contenido cada 24 hs. expresando ésta - determinación con relación al peso del animal, como " mililitros excretados por un Kg. en una hora " (ml/ Kg./ h.).

DETERMINACION CUANTITATIVA DE ACIDEZ

Método de Folin (7)

Reactivos

- 1.- Hidróxido de sodio 0.1 N
- 2.- Solución alcoholica de fenoftaleina al 0.5%
- 3.- Oxalato de potasio neutro.

Método:

Se toma 1 cc de orina y se coloca en un matraz erlenmeyer pequeño, adicionándole aproximadamente 1 gr. de oxalato de potasio, y unos 3 ó 4 ml. de agua dest. y una ó dos gotas de indicador de fenoftaleina, agitando ligeramente para facilitar la disolución del oxalato; procediendo luego a titular el el NaOH 0.1 N colocado en una bureta (de preferencia micro bureta) hasta el vire color rosa permanente, anotando los ml. gastados para neutralizar la muestra.

DETERMINACION DE CALCIO

Método de Webster (8)

Reactivos

- 1.- Acido cloranílico (reactivo analitico de Baker, - al 1% en hidróxido de sodio 0.1 N)
- 2.- Alcohol isopropilico al 50%
- 3.- E.D.T.A. al 5 %
- 4.- Cloruro férrico al 0.6 %
- 5.- Solución estandard de calcio (CaCl_2) 10 mg / 100 ml

Método:

Se rotulan 2 tubos de ensaye " Testigo" " Blanco " y los problemas utilizados como " Problema " .

A los cuales se coloca 0.5 cc de la solución estandar dard , 0.5 cc de agua destilada y 0.5 cc de la muestra de orina, respectivamente; y a cada uno 0.25 cc de ácido cloránico, agitandolos por golpeteo cuidadoso de la parte inferior del tubo, contra madera. Se dejan reposar 30 min.

Al cabo de este tiempo, se centrifugan a 3000 rpm -- por 10 min. - se decantan dejándolos escurrir totalmente sobre papel absorbente, quedando en el fondo de los tubos (excepto el blanco), un precipitado, el cual se lava añadiendo aproximadamente 3 cc de alcohol isopropílico, y se agitan.

Se llevan a la centrífuga nuevamente en las mismas condiciones que antes, se vuelven a decantar y escurrir en la misma forma, se les agrega una gota de E.D.T.A (etilen diamino tetra acetato de sodio), agitando hasta suspender el precipitado, y finalmente se adicionan con 5 ml. de la solución de cloruro férrico.

Se toma su lectura en espectrofotómetro, empleando - longitud de onda de 500 mili micras, y reportando la determinación en micro moles Ca^{++} / Kg./h.

DETERMINACION DE FOSFORO INORGANICO

Método de Fiske y Subbarow (9)

Reactivos

- 1.- Solución de molibdato de amonio al 2.5 % en ácido sulfurico 3 N.
- 2.- Solución de ácido 1-amino 2- naftol 4- sulfónico- al 0.25 %
- 3.- **Solución estandar** de fosfatos (KH_2PO_4) 8 mg/ 100 ml.

Método:

La muestra de orina se diluye 1 a 100 (0.1 cc de orina con 9.9 cc de agua destilada). Se rotulan un tubo de ensayo " Blanco ", otro " Testigo " y " Problema " (todos los problemas necesarios) ; al primero se ponen 8.6 cc de agua dest. - al segundo 0.5 cc de la solución estándar de fosfatos, más 8.1 cc de agua dest. y al tercero 5 cc de la dilución, más 3.6 de agua dest. y a cada uno se añade 1 cc. de molibdato de amonio; y finalmente también a cada uno, -- 0.4 cc de ácido 1- amino 2- naftol 4- sulfónico.

Se dejan reposar (después de agitar por inversión), en ausencia de luz, por espacio de 10 min. al cabo de los cuales se toma su lectura en el espectrofotómetro, con longitud de onda de 610 milí micras . Se reporta como en el caso anterior en micro moles P / Kg / h .

DETERMINACION DE AMONIACO

Reactivos

- 1.- Solución de Nessler
- 2.- Solución estándar de amoniaco $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 10 mg /100 m
- 3.- Goma Gutta

Método :

Se hace una dilución de la orina 1 a 100, y se rotulan tubos "Testigo", " Blanco" y "Problema" ; colocando en el primero 0.25 cc de la solución estándar, más 9.75 cc de agua dest. al segundo, 10.0 cc de agua, y al tercero 2.5 - de la dilución más 7.5 cc de agua; se les añade a todos una gota de goma gutta, y 1 cc de Nessler, agitando ligeramente y se toma su lectura con longitud de onda de 445 milimicras - reportando en micro equivalentes NH_4^+ / Kg./ h.

R E S U L T A D O S

En las gráficas 1 y 2 se expresan los resultados de las determinaciones hechas en los perros. En la primera parte de estas gráficas, se han indicado los resultados de -- los análisis efectuados en la orina de los animales, antes de ser inyectados con aloxana. Se puede observar en las -- gráficas de volumen, que en los dos casos se produjo un incremento, en comparación con la primera parte de la gráfica trazada con los datos en estado normal de los animales.

La excreción de ion hidrógeno, subió paralelamente a la de los fosfatos (gráfica No. 2), así como la del -- calcio y el ion amonio; sin embargo se puede observar fácilmente, que uno de los perros respondió en forma más marcada a la inyección de la aloxana que el otro que apenas -- salió de la normalidad. Por ésta razón se han utilizado para el cálculo de las correlaciones (10), los resultados obtenidos en ese perro que fué el No. 2 .

Así, en la gráfica No. 3 se representa la correlación Calciuria en función de aciduria , y se ha obtenido, un coeficiente de correlación de 0.572, que es perfectamente significativo desde el punto de vista estadístico, y -- una línea de regresión cuyo coeficiente angular es de ---- 0.0241, y la ordenada en el origen 1.04 micro moles C_a /Kg/h

Si comparamos estos resultados con los obtenidos -- por Fdez. Gavarrón y Bernal, observaremos que éste coeficiente angular es más pequeño que el obtenido en caso de los perros a los que se les inyectó ácido láctico.

En la gráfica No. 4 se presenta la correlación Fosfaturia en función de aciduria, también para el perro No.2 obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.73, completamente significativo desde el punto de vista estadístico, y completamente comparable con el obtenido por Fernández Gavarrón y Bernal (6) en un trabajo relacionado.

El coeficiente angular de la línea de regresión, que es de 0.64 es más pequeño que el obtenido en otras ocasiones por los mencionados autores.

Finalmente, se presenta en la gráfica No. 5, la correlación Amoniuria en función de aciduria, con un coeficiente de correlación de 0.725 perfectamente significativo, y una línea de regresión cuyo coeficiente angular es 0.165, y su ordenada en el origen es 10.04 Meq NH_4^+ / Kg / h ; éste coeficiente angular nos está indicando que la excreción de ion amonio no ha subido mucho, debido seguramente a la poca gravedad de la diabetes aloxánica producida.

Las experiencias de Fdez. Gavarrón y Bernal, habían sido hechas en este tipo de animal, y la comparación de los resultados obtenidos por Ellos, con los de éste trabajo -- efectuado con las determinaciones en los perros diabéticos, tendría que mostrar gran semejanza, por haber utilizado la misma especie animal.

T A B L A N o . 1

Excreción media de: Calcio, Fosforo, ion Amonio
ion Hidrógeno y volumen, en la orina de los perros
normales.

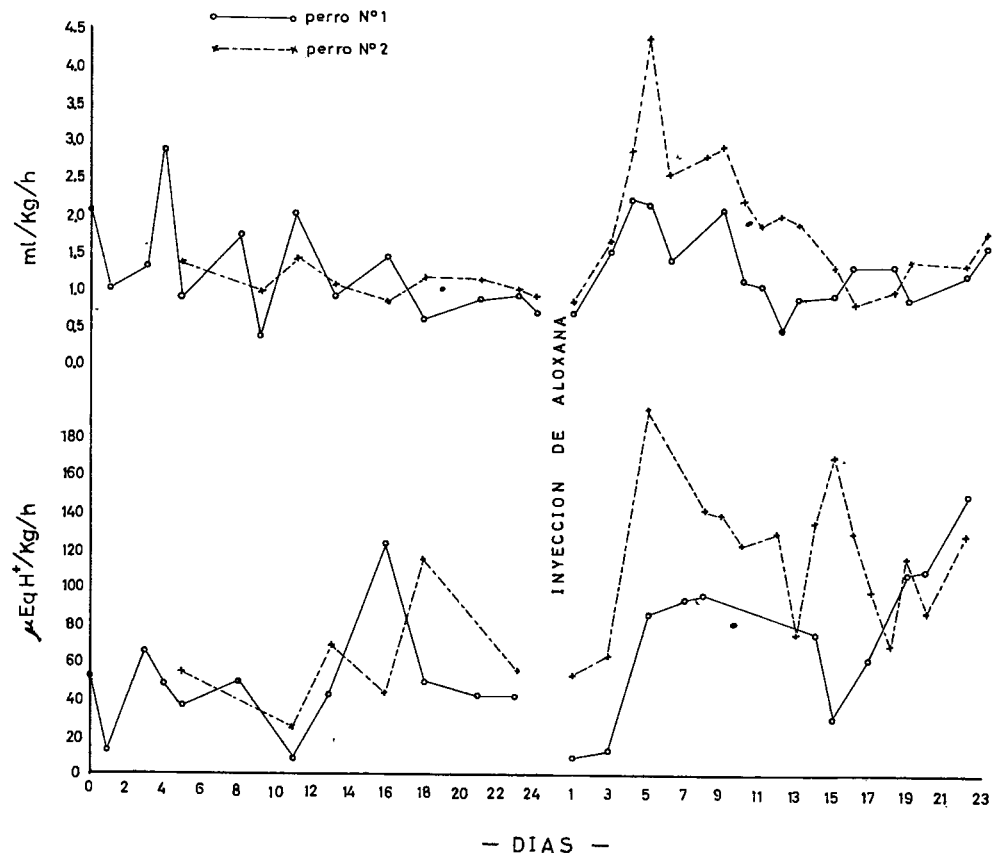
Ca^{++}	$= 2.30 \pm 1.265$	micro moles/ Kg / h
P	$= 35.76 \pm 18.85$	" "
NH_4^+	$= 19.27 \pm 7.38$	" "
H^+	$= 53.14 \pm 30.43$	" "
Volumen	$= 1.204 \pm 0.567$	ml. / Kg. / hora

GRAFICA No. 1

VARIACIONES EN LA EXCRECION DE :

- a) Volumen urinario
- b) Aciduria

En estado normal (primera parte de la gráfica),
y despues de la inyección de aloxana

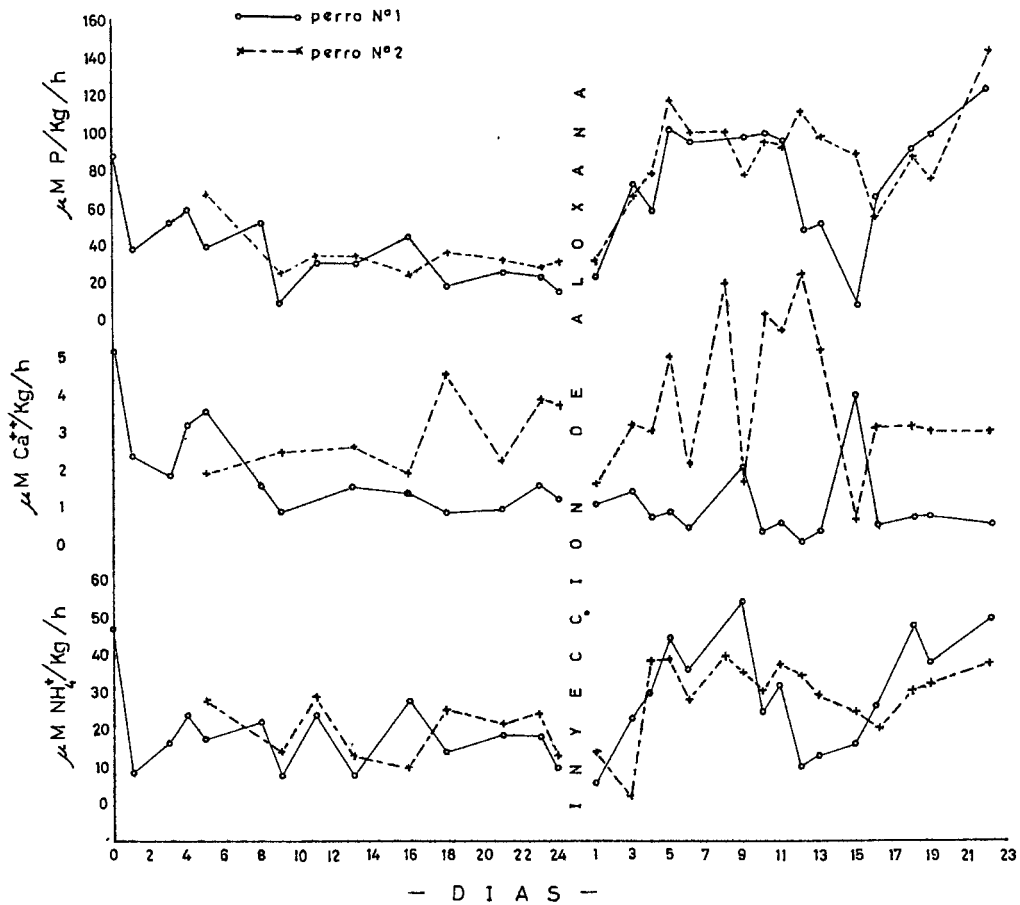


G R A F I C A N o . 2

VARIACIONES EN LA EXCRECION DE :

- a) Fosfaturia
- b) Calciuria
- c) Amoniuria

Antes y despues de la inyección de aloxana.

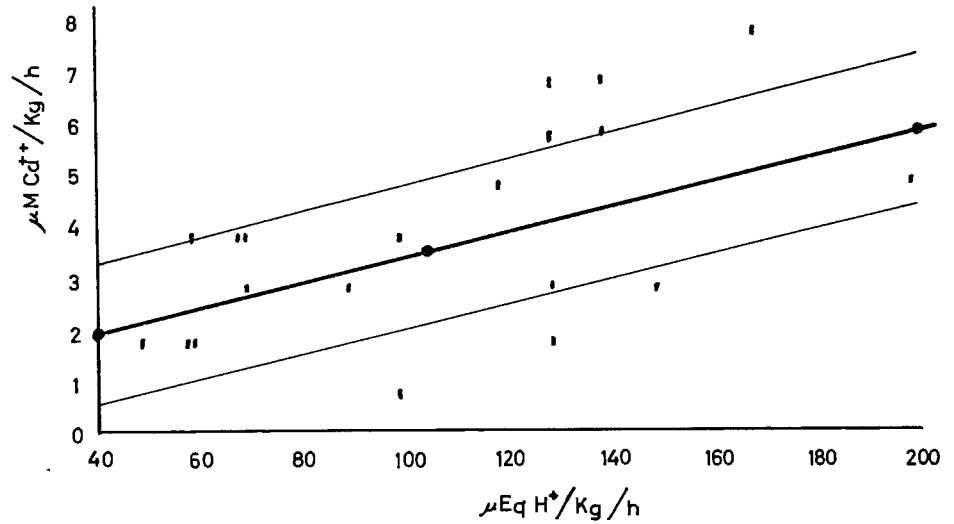


G R A F I C A N o . 3

CORRELACION ACIDURIA CALCIURIA

Perro No. 2 Diabético

$\bar{U} = 0.9$
$\bar{V} = 1.05$
$\sigma_U = 4.07$
$\sigma_V = 1.72$
$r = 0.572$
$\bar{H}^+ = 104$
$\bar{Cd}^+ = 3.55$
$\sigma_{H^+} = 40.7$
$\sigma_{Cd^+} = 1.72$
$\int Ca = 0.0014$



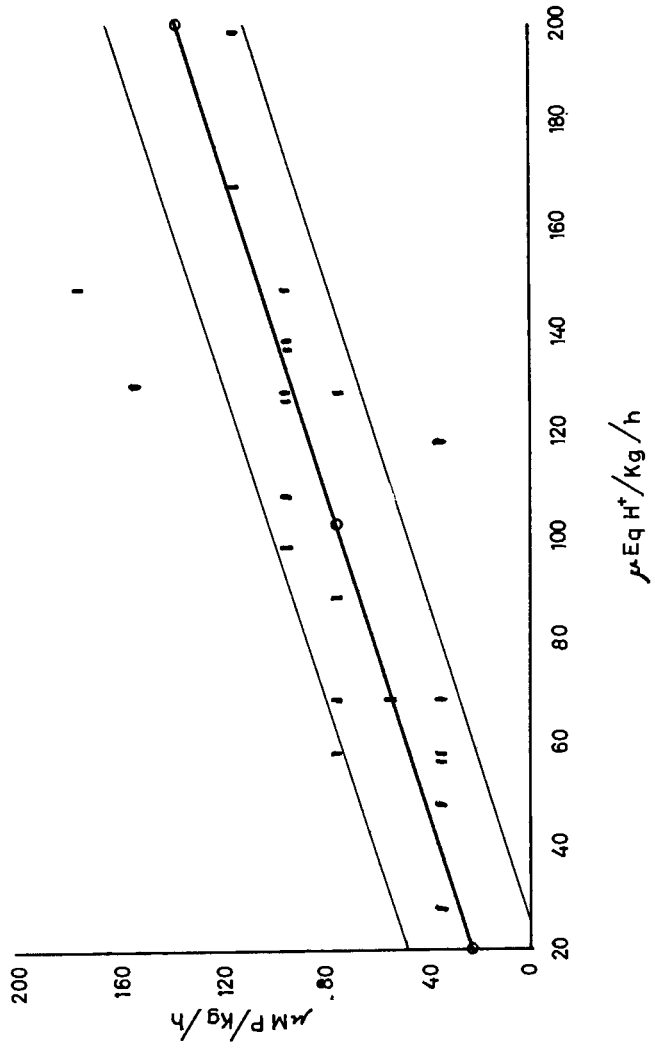
$$Ca = 0.0241 H^+ + 0.0014$$

G R A F I C A · No. 4

CORRELACION ACIDURIA FOSFARURIA

Perro No. 2 Diabético

$\bar{U} = 0.73$
$\bar{V} = -0.68$
$\sigma_U = 4.32$
$\sigma_{\dot{V}} = 1.89$
$r = 0.73$
$\bar{H}^+ = 102.3$
$\bar{P} = 76.4$
$\sigma_{H^+} = 43.2$
$\sigma_P = 37.8$
$\int P = 25.85$



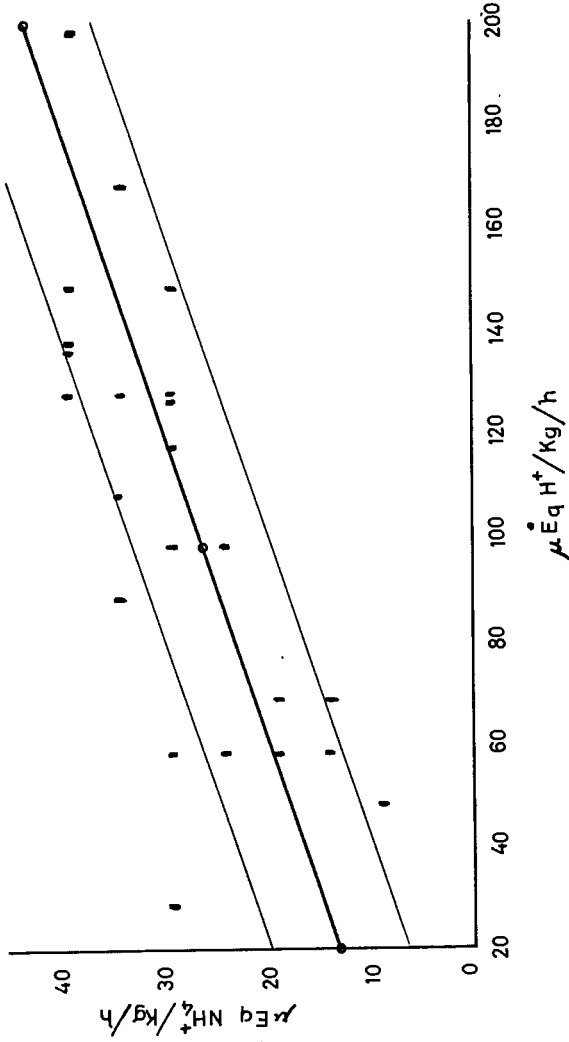
$$P = 0.64 H^+, 10.9$$

G R A F I C A N o . 5

CORRELACION ACIDURIA AMONIURIA

Perro No. 2 Diabético

$\bar{U} = 0.208$
$\bar{V} = 0.71$
$\sigma_U = 4.27$
$\sigma_V = 1.95$
$r = 0.72$
$\bar{H}^* = 97.08$
$\bar{NH}_4^* = 26.05$
$\sigma_{H^*} = 42.7$
$\sigma_{NH_4^*} = 9.75$
$\sum NH_4^* = 6.92$



$$NH_4^* = 0.165 H^* + 10.04$$

DISCUSION

La observación de las gráficas 1 y 2 , demuestra claramente que la inyección de aloxana ha producido todos los fenómenos típicos de la diabetes, es decir; aumento en el volumen urinario, en la acidez, el calcio, fosforo y el ion amonio.

Sabemos que la interpretación que se ha dado a éstos fenómenos, ha sido que el aumento de la concentración de glucosa en sangre, produce un aumento en la osmolaridad del plasma sanguíneo, y además la producción de cuerpos cetónicos - provoca incremento en la concentración de estas sustancias en sangre, con producción de acidosis, y contribuye también al aumento de la osmolaridad del plasma.

Todos estos fenómenos provocan la salida del líquido intracelular, hacia el compartimento extracelular, con salida también de ion fosfato dibásico, y este ion se une con el ion hidrógeno y aparece en orina como fosfato monobásico.

La totalidad de éstas reacciones tienen lugar durante la fase de acidosis, que se conoce con el nombre de " acidosis compensada " ; es decir, cuando estos mecanismos de homeostasis son capaces de evitar que el plasma sanguíneo cambie su composición en su pH, y en la cantidad de bicarbonatos (reserva alcalina) que contiene normalmente el plasma.

A medida que aumenta la formación de ácido en el organismo, se produce un incremento en la excreción de ácidos débiles y de ión amonio, fenómeno que está claramente visible en la última parte de las curvas correspondientes de las gráficas 1 y 2 .

En la gráfica No. 4 se observa éste paralelismo en la excreción de ion hidrógeno, y de ion fosfato, puesto que tiene un coeficiente de correlación de 0.73 significativamente estadístico, y sin embargo tiene un coeficiente angular - la línea de regresión de 0.64 , lo cual nos está indicando - que solamente el 64 % del ion fosfato se está excretando como fosfato monobásico $H_2PO_4^-$ y el resto, el 36 % como ácidos débiles sin haber sido previamente transformados en las sales sódicas, y excretar NaH_2PO_4 en vez del ácido libre.

En la gráfica No, 5 se observa que el aumento en la excreción de ion hidrógeno, vá acompañada de un aumento en la de ion amonio, debido a que el riñón es capaz de obtener amoniaco a partir de aminoácidos, principalmente de glutamina (3), y unir éste amoniaco con el ion hidrógeno para transformarlo en el ion amonio.

Por todo lo expuesto anteriormente, se comprende que exista efectivamente esa correlación entre hidrógeno y el ion amonio, y entre ion hidrógeno e ion fosfato. Pero nosotros creémos que nó existe ninguna teoría para justificar la mayor excreción de calcio, que seguramente proviene de hueso - nó es fácil explicarla a través de las teorías que se han emitido a cerca de la regulación de la calcemia, sin embargo tomando en consideración la hipótesis expuesta por Fdez. Gavarrón y Bernal (6), comprenderémos, no solamente la razón - por la cual se excreta mayor cantidad de calcio, sino además que, al producirse esta disolución de la hidroxapatita de hueso, se está neutralizando en parte el exceso de ácido producido por las alteraciones metabólicas correspondientes a la diabetes.

La razón es ésta : Ellos suponen que los líquidos del organismo, están saturados en calcio y en fósforo, y como en hueso se encuentra también fósforo, e ion calcio, está actuando como una solución saturada en presencia de fase sólida, y por lo tanto la concentración de calcio y de fósforo, está dada por el producto de solubilidad de la hidroxiapatita de hueso. Este producto de solubilidad, viene definido como actividad del ion fósforo dibásico ($\text{HPO}_4^{=}$) multiplicado por la actividad del ion calcio, lo cual es igual a una constante que es el producto de solubilidad de la hidroxiapatita .

$$a_{\text{HPO}_4^{=}} \times a_{\text{Ca}^{++}} = K_{ps}.$$

Al aumentar la acidez del plasma sanguíneo, se desplaza el equilibrio en que se encuentra el ion fósforo dibásico y el monobásico, hacia la formación del monobásico ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$) con lo cual disminuye la concentración del fósforo dibásico, y por lo tanto el plasma sanguíneo queda subsaturado en éstas iones, con lo cual se tiene que disolver hidroxiapatita de hueso y pasar a plasma sanguíneo.

Esta disolución de la hidroxiapatita de hueso, produce los siguientes fenómenos ; en primer lugar, un ligero aumento en la calcemia, que provoca mayor excreción de calcio por -- orina, cómo lo demuestran las gráficas presentadas en el capítulo de resultados. Y en segundo lugar, como el ion fósforo que se encuentra en hueso es en forma de ion fósforo tribásico, pasa a sangre y acepta un H^{+} , para ser transformado en -- ion fósforo dibásico $\text{HPO}_4^{=}$, y aún este ion dibásico es capaz de aceptar otro ion H^{+} para transformarse en ion fósforo monobásico $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$, y ser así excretado por orina.

Esto nos explica que además de producirse hipercalcemia, se neutraliza en parte el exceso de ácido producido durante ésta acidosis metabólica, aún durante la fase conocida con el nombre de " acidosis compensada " ; porque todos estos mecanismos son capaces de evitar variaciones notables, que consideramos fuera de la normalidad en el plasma sanguíneo.

R E S U M E N

La maravillosa red de sistemas amortiguadores orgánicos e inorgánicos presente en la sangre, y el plasma sanguíneo, mediante los fenómenos de intercambio iónico entre estos líquidos, está constantemente en actividad para lograr la eliminación ó retención de ácido, mediante una serie de reacciones químicas y fisicoquímicas más ó menos -- complejas,, formando un ciclo completo de intercambio iónico -- que mantiene constante el pH sanguíneo.

Las modificaciones producidas por la mayor concentración de ácido, y sustancias que aumentan la osmolaridad -- implica una pronta respuesta de los sistemas amortiguadores para devolver la isotonicidad a los líquidos, y en el caso particular de la diabetes, el organismo tiende a excretar el exceso de las sustancias que alteran dicha isotonicidad.

Aún nó lograda totalmente la diabetes aloxánica en los perros, se vé en las gráficas 1 y 2 que en las determinaciones de estos elementos se ha obtenido aumento en todas ellas.

En las correlaciones efectuadas de; Calcio, Fosforo e ion Amonio, cada una de ellas en función de la excreción de ion hidrógeno, dió coeficientes de correlación completamente significativos desde el punto de vista estadístico.

Los coeficientes de correlación indican, en primer lugar, si existe relación entre los elementos de abcisas y de ordenadas, y en segundo lugar, en caso de haber relación -- si los datos obtenidos son estadísticamente significantes -- es decir, que tengan una probabilidad despreciable de -- haber ocurrido al azar, ésto se vé comparando el coeficiente de correlación (r) y el número de puntos utilizados -- con tablas (10) perfectamente estudiadas, en las que nos --

indican si un coeficiente, según el No. de puntos, es significativo estadísticamente.

De manera que todos los datos obtenidos en las determinaciones hechas en éste trabajo, están totalmente concordes con la hipótesis de Fdez. Gavarrón y Bernal D. que explica de manera más clara que la calcemia está regulada, fundamentalmente a través del equilibrio Acido-Base, y al cual, la hiperglucemia producida por la diabetes, logra desviar -- hacia la acidosis.

REFERENCIAS

- 1.- J.S. Fruton and S. Simmonds
John Wiley. London 1953
General Biochemistry (801-813)
- 2.- Cantarow A. and Schepartz B.
Biochemistry Second Edition 1957
(779- 784)
- 3.- Laguna J. Bioquímica
La Prensa Medica Mexicana 1960
Excreción de amoniaco (546- 548)
- 4.- Laguna J. Bioquímica
La Prensa Medica Mexicana
Acidosis y Alcalosis (547- 552)
- 5.- Joslin- Root- White- Marble
The tratment of diabetes mellitus. Tenth edition
Present concepts of diabetes (8-22)
- 6.- Fernández Gavarrón y L. Bernal D.
Relaciones entre el metabolismo del calcio y
el fosforo
y el equilibrio ácido-base
Influencia de la inyección de soluciones
ácidas y alcalinas.
Bol. Inst. Est. Med. Biol. En prensa
- 7.- John A. Kolmer H. Espaulding Howard W. Robinson
Editorial Interamericana - 126. México 1955
Métodoos de Laboratorio
- 8.- Webster N.M
A simple microspectrophotometric method for the
determination of serum calcium
Am. J. Clin. Path 37; 330-332. 1962

- 9.- Fiske C.H. and J. Subbarow
The spectrophotometric method
for the determination of Phosphorus
- 10.- Kenney J.F. Mathematics Statistics
D. Van Nostrand Company N. York 1947
- 11.- Harrow y Mazur
Tratado de bioquímica . Sexta edición
Edit. Interam. 1957
Composición de la orina (423-436)
- Cuerpos cetónicos -