

R. 9. 076



T. D.
M/6

FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA

TESIS PARA EL DOCTORADO

" GLICOPROTEINAS Y DIABETES: VALORACION DE GLICOPROTEINAS
EN LA SECRECION SALIVAR DEL DIABETICO ".

Dirigida por: Prof. Dr. D. J. León Castro (q.e.p.d.) y
Prof. Adj. Dr. D. P. Sánchez Guijo.

Autor: Ldo. Vicente Martinez Puentes.

Sevilla, Septiembre de 1.973.





PEDRO SANCHEZ GUIJO, PROFESOR ADJUNTO DE PATOLOGIA Y
CLINICA MEDICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA

CERTIFICO : que el trabajo titulado " GLICOPROTEINAS Y
DIABETES: VALORACION DE LAS GLICOPROTEINAS
EN LA SECRECION SALIVAR DEL DIABETICO", pre-
sentado por D. VICENTE MARTINEZ PUENTES, Li-
cenciado en Medicina y Cirugia, para aspirar
al grado de Doctor en Medicina, se comenzó
bajo la dirección del Prof. Dr. D. José León
Castro (q.e.p.d.) y terminado bajo mi dirección,
ha sido realizado en las dependencias de la 1ª
Cátedra de Patología y Clínica Médicas de la
Facultad de Medicina de Sevilla.

Sevilla, 3 de Septiembre de 1973.

Ilmo. Tribunal:

El trabajo que tengo el honor de presentar y con el que aspiro al grado de Doctor, ha sido realizado en su totalidad - en las dependencias de la Iª Cátedra de Patología y Clínica Médicas de la Facultad de Medicina de Sevilla, que dirigía hasta su reciente fallecimiento el Prof. D. J. León Castro.

Lleva por título: "Glicoproteínas y Diabetes: Valoración de glicoproteínas en la secreción salivar del diabético". Es el resultado de muchas horas de estudio, así como de trabajo clínico y de laboratorio, durante los cuales he podido apreciar la importancia de la labor en equipo.

Desde aquí, mi agradecimiento al Prof. Sanchez Guiso, que desde el primer momento me ayudó a resolver cuantos problemas se plantearon y alentó ante todas las dificultades surgidas. A mis compañeros y amigos Drs. Yañez Polo, Ortiz Leyba, Villar Ortiz, Pachón Díaz, Rodríguez - Piñero, Núñez Castañ y Medina Redondo; sin cuyo apoyo y colaboración no se hubiese podido realizar.

Es mi deseo, que el presente trabajo, refleje de alguna forma la sencillez y la seriedad que D. José León Castro nos inculcó a todos los que tuvimos el privilegio de sentirnos algo suyos.

INDICE
=====

CAPITULO		PAGINA
I	INTRODUCCION AL ESTUDIO DE LAS GLICOPROTEINAS	
	- Introducción	1
	- Concepto y desarrollo histórico	2
	- Clasificación	7
	- Estructura	7
	- Biosíntesis	11
	- Catabolismo	20
	- Aplicación clínica	21
II	GLICOPROTEINAS Y DIABETES	23
	- Metabolismo de la glucosa	24
	- Interconversión de hexosas	29
	- Control de la interconversión de hexosas.	31
	- Repercusiones de la insuficiencia de insulina	33
	- Resumen	37
	- Insulina y síntesis proteica	42
III	GLICOPROTEINAS EN LA SECRECION DE LAS GLANDULAS SALIVARES	45
	- Glicoproteínas en las secreciones mucosas	46
	- Proteínas de la saliva	51

CAPITULO		PAGINA
IV	JUSTIFICACION	54
V	PLANTEAMIENTO.	57
VI	MATERIAL Y METODOS	61
	- Material	62
	- Métodos :	
	- De extracción salivar	65
	- De laboratorio	66
VII	RESULTADOS	78
VIII	DISCUSION	103
IX	CONCLUSIONES	107
X	BIBLIOGRAFIA	110

I

INTRODUCCION AL ESTUDIO DE LAS GLICOPROTEINAS

INTRODUCCION

=====

A todas aquellas proteínas que tienen una unión covalente con un grupo prostético carbohidrato, podemos llamar Glicoproteínas (1). Estas proteínas conjugadas, se encuentran presentes, y de forma activa a todos los niveles del juego biológico, así son proteínas: hormonas, anticuerpos, enzimas y constituyentes de las membranas basales y celulares (2, 3).

En estos últimos tiempos, el interés por el estudio de estas sustancias, ha experimentado gran auge, estando los trabajos por un lado, dirigidos hacia el conocimiento de su estructura y metabolismo, y por otro, a comprender su función y fisiopatología; estando centrada la problemática actual en su interrelación entre estados de salud y enfermedad.

CONCEPTO Y DESARROLLO HISTORICO.-

A la simple definición antes dada de lo que es una glicoproteína, se ha llegado por un largo camino que comienza con los trabajos de HAMMARSTEN (4), en 1.891, que fué quien introdujo el término "mucoide", y lo separaba de las mucinas por sus propiedades físicas (solubilidad en ácidos, precipitabilidad...)

En 1.925 LEVENE (5), introduce el término mucoproteína, diferenciando dos categorías: las que tenían un grupo prostético condroitin - sulfato y las que lo tenían mucoitin - sulfato. Estableciendo así, erroneamente, que todas las mucoproteínas son sulfatadas y que tienen ácidos urónicos, difiriendo en la naturaleza del azúcar, condrosamina en el primer grupo y quitosamina en el segundo.

En 1.938 MEYER (6), basandose en las características químicas distingue: Mucopolisacáridos y Glicoproteínas; a los primeros, según su contenido en ácidos urónicos, en mucopolisacáridos ácidos y neutros; y dentro de los ácidos en sulfatados y no sulfatados.

A - Mucopolisacáridos

1 - Conteniendo ácido urónico.

- a - Sin grupos sulfato. Ej. ácido hialurónico.
- b - Con grupos sulfato. Ej. ácido condroitin -

sulfato.

2 - Mucopolisacáridos neutros de composición conocida.

Ej. quitina y sustancias de los grupos sanguíneos.

B - Glicoproteínas, conteniendo mucopolisacáridos neutros de composición desconocida (ovomucoide, ovomucina, mucoide serico,,).

En 1.945 y 1.953 (7), MEYER vuelve a rehacerla, basándose en el tipo de enlace entre la proteína y la fracción carbohidrato y así distingue:

- Mucoproteínas, en las que el grupo prostético es un mucopolisacárido unido de forma iónica a la proteína.
- Mucoides, de contenido en hexosamina superior al 4 % y con enlace covalente. A su vez pueden ser: Neutros (mucoides del plasma) y ácidos (orosomucoide, secreción de las glándulas submaxilares).
- Glicoproteínas, grupo prostético carbohidrato con hexosamina con una cuantía inferior al 4 %, unido de forma covalente a la proteína.

Desde este momento se imbrican los términos mucopolisacáridos y mucoproteínas, que conducen a frecuentes equívocos, como STACEY (8) en 1.946, lo sostiene en su clasificación:

- Mucopolisacáridos: Complejos mucopolisacáridos - proteína de escaso contenido protéico.
- Mucoproteínas; Complejos carbohidrato - proteína con elevado contenido protéico, llevando siempre hexosamina y de actividad química similar a las proteínas.

Seguidamente las denominaciones se multiplican y se hacen disparejas (9, 10, 11, 12, 13), y es en 1.960, JEANLOZ (14), quien establece una directriz demasiado enérgica y propone suprimir el prefijo "muco" en toda clasificación, opinión reforzada por HEREMANS y SCHULTZE (26):

1 - Polisacáridos puros: son los mucopolisacáridos clásicos y que tras la reunión Subcomité sobre la nomenclatura de los polisacáridos de la Sociedad Química Americana, son llamados Glicosaminoglicuronoglicanos o simplemente Glicosaminoglicanos (GAG).

2 - Compuestos conteniendo un componente carbohidrato unido a un polipeptido por un enlace débil (salino ó iónico). Llamados también polisacáridos - proteína complejo.

3 - Compuestos conteniendo un componente carbohidrato unido a un polipeptido por un enlace covalente. Son las glicoproteínas.

4 y 5 - Son grupos referidos a glicolípidos.

Actualmente es la clasificación de GOTTSCHALK (1.962) (1, 31), la que alcanza mayor predicamento y que permanece inmutable pese a los recientes avances que se han efectuado en este campo. Este autor clasifica a los compuestos carbohidrato - polipeptidos en:

a) GLICOPROTEINAS.- Proteínas conjugadas conteniendo como grupo prostético uno o más heterosacaridos, con un relativo bajo nº de residuos azucarados, no llevando una unidad seriada repetida y de unión covalente a la cadena polipeptídica.

b) COMPLEJOS CARBOHIDRATO - PROTEINAS.- Llamados también glicopéptidos, proteoglicanos, aminoglicanos o simplemente complejos mucopolisacárido - proteína, los cuales llevan una unidad seriada repetida con un relativo alto número de residuos azucarados; en algunos el enlace puede ser covalente y en otros, electrostático.

El primer grupo, es el que los autores actuales consideran que son las glicoproteínas propiamente dichas y engloban a la casi totalidad de las proteínas animales, exceptuando a la albúmina sérica, que tiene azúcares en pequeñísima cantidad.

A la inversa, los únicos polímeros carbohidrato que no contienen proteínas, son el glucógeno y el a.hialurónico.

por el contrario, los aminoglicanos, no son más que los mucopolisacáridos clásicos que se encuentran unidos a un grupo proteico como una forma de estar en la substancia fundamental del conectivo, puesto que su presencia en forma aislada es muy dudosa, excepción hecha por el momento del a.hialurónico.

Finalmente debemos deslindar un término que se presta a confusión, el de Mucoproteína, término que utilizó WINZLER (32), para definir a aquellas glicoproteínas que eran solubles en el a. perclórico y que correspondían al seromucoide de MEYER (6 y 7).

Ratificando lo dicho anteriormente exponemos debidamente enumeradas en siguiente cuadro (cuadro nº 1), las diferencias entre glicoproteínas y proteoglicanos elaborado por nosotros (33).

	GLICOPROTEINAS	M.P.S.-PROTEIN COMPLEJO
GRUPO PROSTETICO	Heteropolisacarido	Unidades disacaridas repetidas
PROPORCION H de C/Protido	Protido superior	H de C superior
TIPO DE ENLACE	Covalente	Covalente ó Electrostático
PRESENCIA DE URONICOS	NO	SI

CUADRO 1

Tipo	Porcion proteica	Porcion glicidica				
		Hexosas	Hexosaminas	Ac.Sialico y otros.	SO ₄	Enlace
GLICOPROT. SERICAS	PROTEINAS GLOBULARES	Gal (Glu) Man	N-Ac-Gluc. N-Ac-Gala.	+ Fucosa	-	N-gli. (O-gli)
SECRECIONES MUCINOSAS	RICAS EN SERINA Y TREON.	(Gal) (Man)	N-Ac-Gal. (N-Ac-Glu)	+ Fucosa	-	O-gli
GLICOPROT. ESTRUCTURA	VARIABLES DEPENDIENTES DEL TEJIDO	Gal Glu Man	N-Ac-Glu (N-Ac-Gal)	+ Fucosa	(+)	N-gli

CUADRO 2

Los ácidos sialicos y la fucosa son siempre terminales y las hexosas neutras, se encuentran casi siempre en posición intermedia.

Las glicoproteinas séricas (CUADRO, nº 3), como toda glicoproteína ve sujeta su estructura química a las distintas combinaciones de estos compuestos, los cuales intervienen en diferente cuantía dando carácter propio y personalidad a cada una de ellas.

Los porcentajes que se le atribuyen varían según los autores; valga como ejemplo el estudio comparativo que hacen WINZLER (52) y KERBEY (53).

Hexosas	1,61 g /	100 g.	proteína
Hexosamina	1.01	id	id
A. Siálico	0.84	id	id
Fucosa	—	—	—
A. Urónico	—	—	—

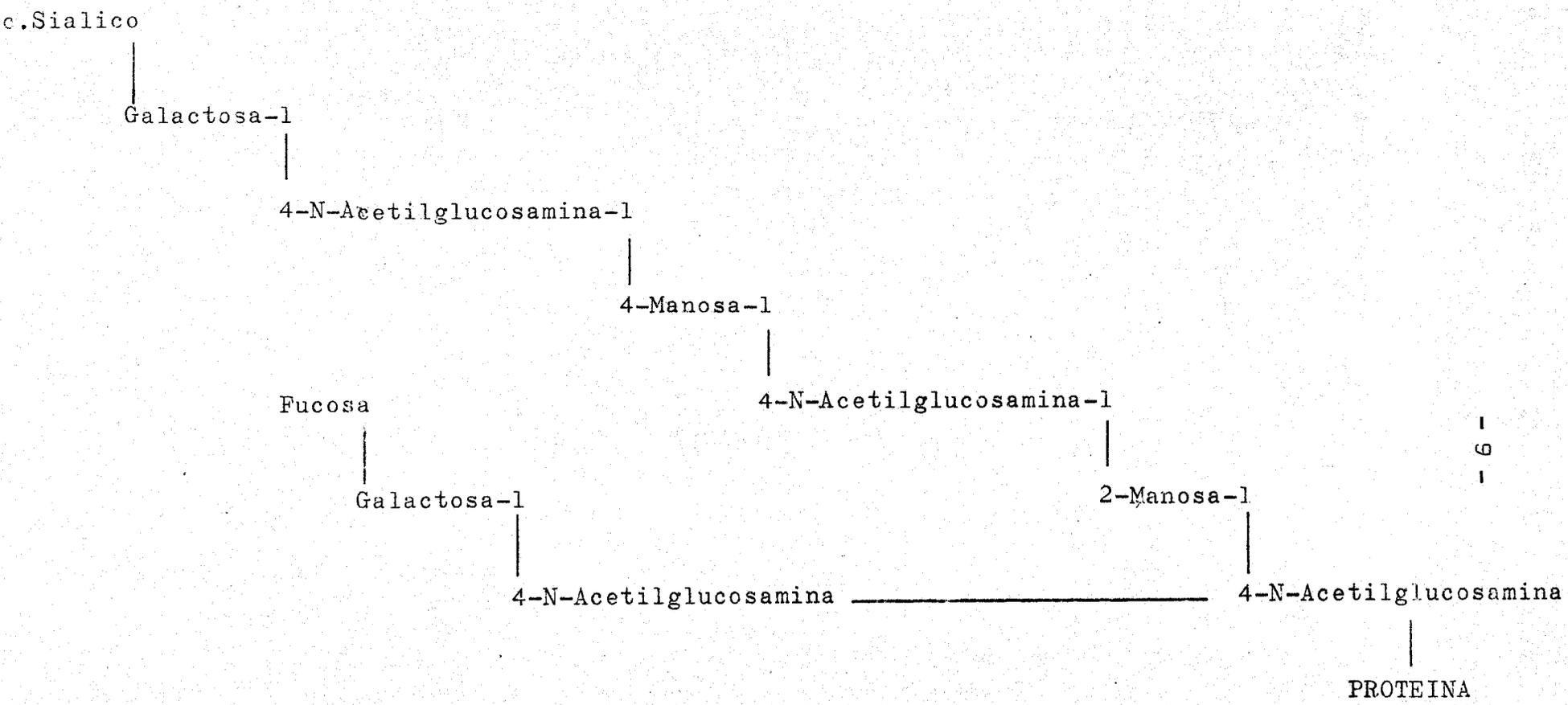
El propio WINZLER (54), reconociendo la inexactitud evidente de estos valores medios, los rehace y establece lo siguiente:

Hexosas	14.3 %	peso seco
Hexosamina	10.-	id
A. Siálico	9.-	id
Fucosa	1.-	id
Proteína	68.-	id

Estos valores son naturalmente globales, puesto que los porcentajes particulares difieren notablemente de las medias más arriba expuestas.

ESTRUCTURA DE LA GLICOPROTEINA.

(Tomada de J. Labat)



- 6 -

CUADRO 3

Así mismo es muy interesante el tipo de unión con la proteína, SIMKIN (16), describe los siguientes modelos:

- 1 - Tipo acetyl-glicosamina: es el más común (55,56), se da en casi todas las glicoproteínas plasmáticas, .- ovoalbúmina de gallina (57,58), ovomucoide (59,60), .- el enlace se hace entre la asparagina y el grupo .- reductor de la N-acetilglicosamina.
- 2 - Tipo O-glicosídico: adopta varias formas:
 - El grupo hidroxilo de la serina o de la treonina, enlaza con la N-acetilgalactosamina. Se da también en las proteínas plasmáticas (61,62), sustancias de los grupos sanguíneos y mucinas (1,57,63,64,65).
 - El grupo hidroxilo de la serina, se une a la xilosa. -- Esto se da en los complejos Mucopolisacáridos-proteína (66,67,68).
 - El grupo hidroxilo de la hidroxilina se une a la galactosa. Esto ocurre en las glicoproteínas de la membrana basal del glomérulo y en el colágeno (70,71).

A pesar de la casi infinita variedad de estructuras que -- pueden ser formadas por los azúcares presentes en las glicoproteínas en razón de las variaciones en la secuencia, uniones y ramificación -- estudios detallados estructurales, han demostrado, que persiste de una forma relativamente conservadora una pauta más o menos estereotipada de la utilización de estos azúcares. La secuencia NAN-galactosa N- acetilglucosamina ligada a una manosa y con un residuo terminal N-acetil-

glucosamina, es un modelo bastante común en glicoproteínas del tipo de la fetuina (72,73) α_1 glicoproteína ácida (1), α_2 macroglobulina (74), tiroglobulina (75), gonadotropina coriónica (76) Ig G, Ig A (77) y las glicoproteínas de la membrana basal glomerular (77).

BIOSÍNTESIS.-

Es aquí donde abundan con mayor insistencia las comunicaciones científicas.

En estos problemas hemos de considerar varios aspectos:

a) lugares donde se sintetizan.-

De forma simple pero eficaz, diremos que se forman en el mismo sitio donde se sintetiza la proteína portadora (78,79,80,81), así las del plasma se forman fundamentalmente en el hígado (81 bis), la tiroglobulina en el tiroides, las de estructura en los propios tejidos (etc.).

Un origen posible, invocado por algunos autores, a partir de la despolimerización de los mucopolisacáridos de la sustancia fundamental del conectivo debe ser totalmente desestimado. Por un lado, el incremento de complejos carbohidrato-polipeptidos que ya CACHPOLE (82) encontraba aumentado en los extractos que hacía de tejido conectivo de ratones con tumores trasplantados y que fué punto de partida para esta hipótesis, no presentan ácidos urónicos ni ésteres sulfatados. Por otro, las experiencias de LARKY (83), quién tras inyectar hia-

luronidasa y colagenasa, no encuentra correlación evidente entre el incremento de las glicoproteínas séricas y la destrucción de mucopolisacáridos; así como las de MUSIL (84), que demuestra que las glicoproteínas séricas aumentan no durante la fase de destrucción celular sino más bien en la de proliferación.

b) Estructuras intracelulares donde se realiza la síntesis.

La porción protéica es sintetizada en los ribosomas (85). La porción hidrocarbonada, sin embargo puede engarzarse según una gama de posibilidades no desveladas aun del todo y que pueden resumirse en los siguientes tipos:

- 1.- El núcleo carbohidrato en bloque se une al polipeptido en los ribosomas.
- 2.- Que se una también de forma global pero una vez que haya abandonado el polipeptido las ribosomas y se encuentre en el retículo endoplásmico.
- 3.- Combinación de ambas posibilidades, parte se engarzaria en los ribosomas y parte en el retículo endoplásmico.

Según los últimos trabajos, este tercer camino, es el más aceptable. Tras las investigaciones de SARCIONE (17), MOLNAR (18) HALLINAM (19), SIMKIM (16), LOUISOT (20), SPIRO (22) etc..., podemos establecer que el lugar más importante de incorporación de la glucosamina, es en las membranas endoplásmicas, y dentro de ellas, en la porción lisa, en mayor proporción que en la rugosa (86,87). Le sigue

luego en importancia la incorporación a nivel de los ribosomas y por último la producida en la fase citoplásmica. Estos resultados han sido exhaustivamente estudiados en los hepatocitos, en las células de la mucosa intestinal y del tiroides. Usando glucosamina marcada con C-14 (HALLIMAM, 19) ó H3 (LOUISOT, 20,21) y la combinación con puromicina que interfiere las cadenas polipeptídicas a nivel ribosomal mostrando así el grado de incorporación de la hexosamina (LAWFORD y SCHACHTER, 23).

Existe unanimidad ante el hecho de que la mayor parte de la hexosamina se incorpora al núcleo polipeptídico en los ribosomas; se sabe además que la mayoría de los azúcares centrales de las cadenas glucídicas son fijados a éstas por enzimas presentes en las membranas subcelulares endoplásmicas, mientras que los glúcidos terminales son fijados probablemente por sistemas enzimáticos localizados en la fase citoplasmática no particular. Esto va de acuerdo con los resultados obtenidos por NEUTRA y LEBLOND (88,89) quienes parecen poner en evidencia por autoradiografía una fijación importante de la fucosa a nivel del aparato de Golgi. No obstante SPIRO y SPIRO, demuestran en las membranas endoplasmáticas, sistemas enzimáticos que incorporan el ácido siálico.

Lo que parece apuntar que dentro de unas líneas generales, comunes a todas las células, los diferentes pasos de síntesis se hacen de una forma más o menos similar; pero cada tejido o cada célula en particular, pueden tener características propias en cuanto a la localización

y tiempo de actuación de los sistemas fermentativos y que va unido a la personalidad del propio tejido o a las circunstancias por las que atraviese.

c) Mecanismo de biosíntesis.-

Se ha demostrado, que el mecanismo de unión de los elementos del carbohidrato, implica una serie de glicosil-transferasas que funcionan transfiriendo un azúcar activado, como derivado nucleótido a un aceptor macromolecular. Esta síntesis depende de la especificidad de éstos enzimas que está orientada hacia el azúcar nucleótido y el aceptor, siendo determinante de la especificidad, tanto las bases purina, pirimidina, como los azúcares activados por los nucleótidos, jugando papel en el aceptor, la naturaleza de la cadena peptídica y la secuencia de aminoácidos en la vecindad del que interviene en la unión con el azúcar. Estas transferasas se han demostrado con el ácido siálico (90,91,92), galactosa (93,94,95,96), glucosa (97), N-acetilglucosamina (98), N-acetilgalactosamina (99,100), sin embargo el aceptor no está siempre bien definido; excepto las sialil-transferasas, casi todos los demás enzimas están estimulados por Mn.

La primera transferasa une el primer azúcar sobre la cadena peptídica ya salida del polisoma, teniendo que ser grande la especificidad de este enzima, como demuestran ROSEMAN y CARLSON (91), en sus estudios sobre la UDP-galactosamina-transferasa en la glándula submaxilar del carnero, la cual es inactiva sobre más de 50 proteínas -

diferentes y solo actua sobre el polipéptido obtenido por desialización de la mucina submaxilar ovina, seguida de tratamiento por la beta-Nac-galactosaminidasa. La discusión de este problema es difícil dado el pequeño número de transferasas de iniciación aisladas y estudiadas, pero parece quizás probable, que la especificidad de esta primera transferasa, deba de ser calzada sobre la de la proteina portadora y seria determinada por la estructura de la misma. Las secuencias primarias reconocidas por estas transferasas de iniciación, serian poco numerosas, limitando asi el número de las mismas. Esta hipótesis es compatible con el pequeño número de uniones glicopeptídicas identificadas.

Las transferasas que unen los otros restos azucarados sobre el primer azucar ya unido a la cadena polipeptidica, son menos específicas como se ve al constatar las variaciones importantes en las fracciones relativamente homogéneas aisladas a partir de una glicoproteina. La síntesis de las cadenas oligosacáridas de estas unidades, se ha probado que se realizan por la adición paso a paso, de los restos azucarados de la cadena sialil-galactosil-N-acetil-glucosamina.

Abordando otro aspecto de este mismo proceso, podemos decir que parece que el crecimiento y la terminación de las cadenas azucaradas, pueden hacerse según variantes de un plan único, es la llamada, microheterogeneidad con distintas hipótesis sobre los tiempos de acción y el lugar de la misma transferasa que puedan explicarla, o por la falta de oportunidad para ejercer su acción aún cuando -

esté presente.

d) Regulación de la síntesis de las glicoproteínas:

Esta se efectúa sobre la selección de azúcares, su secuencia, su tamaño y el modo de unión.

Solo la proteína portadora, está condicionada por el genoma, por lo que las demás regulaciones deben hacerse por métodos indirectos, es decir, por la síntesis de transferasas más o menos específicas.

Parece ser que existe una correlación entre la composición de una glicoproteína y su lugar de origen. Ello estaría en relación con los " factores de selección " que difieren de una célula a otra y que dirigen la síntesis de glicoproteínas muy diferentes. Estas regulaciones cualitativas se verían acompañadas de otras cuantitativas.

Existen los siguientes tipos de regulación:

1.- Nivel genético:

A este respecto los conocimientos actuales son muy escasos. Que debe existir, no cabe duda, toda la patología congénita de las mucopolisacaridosis lo atestiguan. Las malformaciones que pueden derivar de anomalías cromosómicas, podrían acelerar o por el contrario enlentecer, la síntesis de las macromoléculas a que nos estamos refiriendo. Esta nueva concepción de malformaciones por sobre o infra dosificación genética, demuestra que estas regulaciones deben ser cualitativas y cuantitativas

a la vez. Es decir sobre la síntesis de los enzimas sobre su activación y sobre su acción transferidora sobre la proteína portadora.

Varias hipótesis han surgido, para explicar estos -- mecanismos, consistentes a menudo a la transpolacion de mecanismos genéticos que se dan en los microorganismos . Una hipótesis apta para englobar los conceptos arriba expuestos es la de BRITTEN y DAVIDSON (101) los cuales sostienen que sobre cada unidad -- genética operacional se presentan cuatro tipo de -- genes de regulacion con el mismo concepto de - --- " bacteria " (101), o de " operón " (102) - ---

- a) Un gen sensor.
- b) Uno o varios integradores.
- c) Uno o varios receptores.
- d) Un gen de producción o gen de estructura.

La estimulación de este sistema, se hace de forma gradual, activándose paulatinamente cada uno de los genes o sistemas de genes enumerados. El primero en reaccionar, sería el gen sensor, quién sería estimulado por -- una " señal externa " posiblemente por un estímulo -- químico, pudiendo hacerse este mecanismo de una forma directa o de una forma indirecta por medio de una -- proteína portadora que captase específicamente esta señal química; entonces reacciona el gen sensor acti-

vando al integrador; éste último sintetizaría una molécula de ARN específica con secuencia exclusiva de un gen receptor que quedaría así activado, al conjunto de genes receptores actuando sobre varias baterías según el concepto de " Operón " inducirían al gen de producción, análogo al de estructura, quién daría lugar al nacimiento de ARN-mensajeros que seran más tarde traducidos en los ribosomas del citoplasma. Según la abundancia y comportamiento de los genes de recepción e integradores, habrá diferentes tipos de regulación.

La relación entre la producción de la proteína portadora y la síntesis de las cadenas glucosídicas puede admitirse que se haga al reaccionar la cadena protéica sobre un gen sensor que pertenezca a una " batería " de enzimas, comportando así un mecanismo de regulación en cascada de tipo positivo (producción de enzimas en caso de producción de proteínas portadora). El exceso de proteína portadora podría reprimir su propia síntesis.

Otro punto para tratar, serían las regulaciones internas en la producción de determinadas enzimas y que iría en detrimento de otros, en determinados momentos evolutivos de la vida: infancia, adolescencia, senec-

tud, embarazo, etc. en los que los valores de las glicoproteínas séricas se modifican (103,104,105).-- El descubrimiento de estos mecanismos de represión parcial podría llevarlos a los fenómenos de " inducción " embriológica así como a la especialización tisular.

2.- Nivel celular:

En este apartado irían incluidos los mecanismos -- todavía desconocidos que regulan la velocidad de -- utilización de los ARN-mensajeros almacenados en el -- citoplasma, así como los que asignan a ciertos ribosomas la tarea de sintetizar determinadas proteínas -- y no otras (106). También participan en esta fase la regulación en la organización de las transferasas (107,108).

3.- Nivel enzimático:

Clasificamos en esta categoría las regulaciones por -- " feed-back " o retroalimentación positiva o negativa basadas sobre la naturaleza alosterica de ciertos enzimas que intervienen en la síntesis de las -- glicoproteínas. Puede ser un ejemplo la UDP-Nac-glicosaminidasa, quien inhibe la formación de la glucosamina 6 P , a partir de la glucosa-6 P y de la glutamina, regulando así de una manera eficaz la tasa de

síntesis de este precursor de numerosas glicoproteínas. Un ejemplo más es la activación alostérica de UDP- Nac glucosamina-2-epimerasa (109) por el ATP; en ausencia de ATP, este fermento es muy poco activo.

4.-Nivel tisular:

Es aquí donde actúan las hormonas, ciertas sustancias de síntesis de acción farmacodinámica y sobre todo los -- estímulos todavía desconocidos que regulan el desarrollo armonioso de los tejidos (110). Estas regulaciones son responsables de la constancia de la proporción parénquima/conectivo. La inhibición de las mismas aboca la esclerosis, fibrosis, cirrosis, como ejemplos más -- demostrativos.

CATABOLISMO DE LAS GLICOPROTEINAS.-

Se efectúa a expensas de los enzimas líticos que encierran los -- lisosomas y que actúan en la degradación de gran número de macromoléculas tales como los ácidos nucleicos y proteínas. Los más conocidos pertenecen a las glicosidasas (111,112,113,114).

Así mismo, se ha probado, que los enzimas que hidrolizan la N-acetil-glucosaminidil-asparagina (115) y la N-acetil-galactosaminil-serina (116), están también en los lisosomas, pudiendo trabajar -- quizás en compañía de las proteasas, completando así la degradación -- de las glicoproteínas (117).

APLICACION CLINICA.-

Lo que primeramente llama la atención de las glicoproteínas es su gran difusión orgánica. Así se encuentran en el suero - membranas basales, membranas celulares, en la llamada sustancia fundamental del conectivo, en las secreciones mucosas (SALIVA) y serosas. Mayor representatividad no se alcanza por ninguna otra sustancia en el organismo.

Hay dos hechos que hacen difícil el estudio conjunto de las glicoproteínas: la gran dispersión en cuanto a estructura y la enorme importancia del grupo prostético. El papel que el componente hidrocarbonado juega en la realización de la función es enormemente variable: así la viscosidad y capacidad de lubricación de las secreciones mucosas dependen de los hidratos de carbono y concretamente del residuo del ácido siálico. Por el contrario la supresión del ácido siálico en algunas glicoproteínas transportadoras, no modifican su función.

Desde los trabajos de GREENSPAN (24) continuados por SHETLAR, SPIRO, GOTTSCHALK, HEREMANS (25), SCHULTZE (26), MONTREUIL (27), CHANDLER (28) se vienen comprobando los niveles de estas glicoproteínas en los diferentes estados de salud y enfermedad. Constantes comunicaciones se vienen sucediendo bajo estos aspectos (29, 30) aunque no estén desvelados totalmente. La total comprensión de estos procesos, podrá llevarse a cabo cuando se haya llegado a un -

conocimiento definitivo sobre la regulación de la síntesis de la glicoproteínas.

.0-0-0-0-0-0-0-0.

II

GLICOPROTEINAS Y DIABETES

A) METABOLISMO DE LA GLUCOSA.-

Los diversos destinos que puede seguir la glucosa sanguínea, se resumen en el cuadro nº 4, tomado de White.

Inmediatamente después de haber penetrado en la célula, la glucosa es fosforilizada en la posición 6 por el ATE, en presencia de hexoquinasa y del ión Mg^{++} . Esta reacción es irreversible y exoenergética. Por otra parte dado que la membrana celular es impermeable para los ésteres del ácido fosfórico, la fosforilización de la glucosa deja encerrada a esta sustancia en el interior de la célula.

A partir de la glucosa - 6 P, se pueden seguir seis caminos que quedan resumidos en el siguiente cuadro (cuadro nº 5), tomado de Willians.

1º.- La glucolisis, conocida también como vía de EMBDEN-MEYERHOFF. Constituye junto con la fermentación alcohólica, la vía más corriente de fermentación anaerobia, conducente a la obtención de energía a partir de combustibles tales como la glucosa.

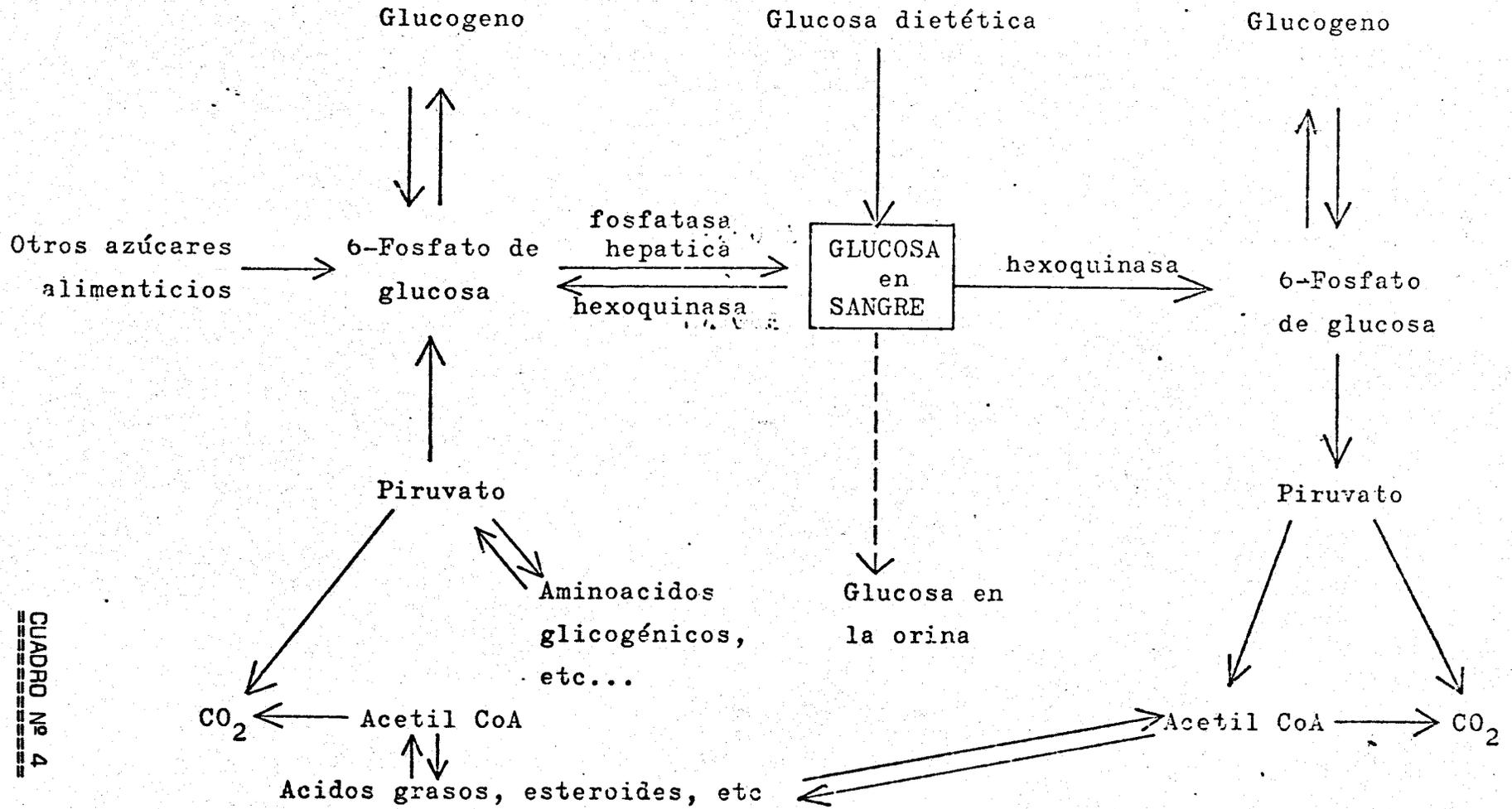
2º.- Fermentación alcohólica, la secuencia reaccional es idéntica a la anterior, con la diferencia de que en vez de reducirse a lactato, el piruvato se decarboxila a acetaldehído, el cual a su vez es reducido a etanol.

3º.- Vía oxidativa del fosfogluconato, por la que la glucosa - 6 P, se oxida a fosfatos de pentosas mediante una secuencia de reacciones que tienen lugar en el citoplasma soluble. El aceptor electrónico de estas reacciones es el NADPH; el NADPH así formado es un reductor principal en la síntesis de biomoléculas ricas

H I G A D O

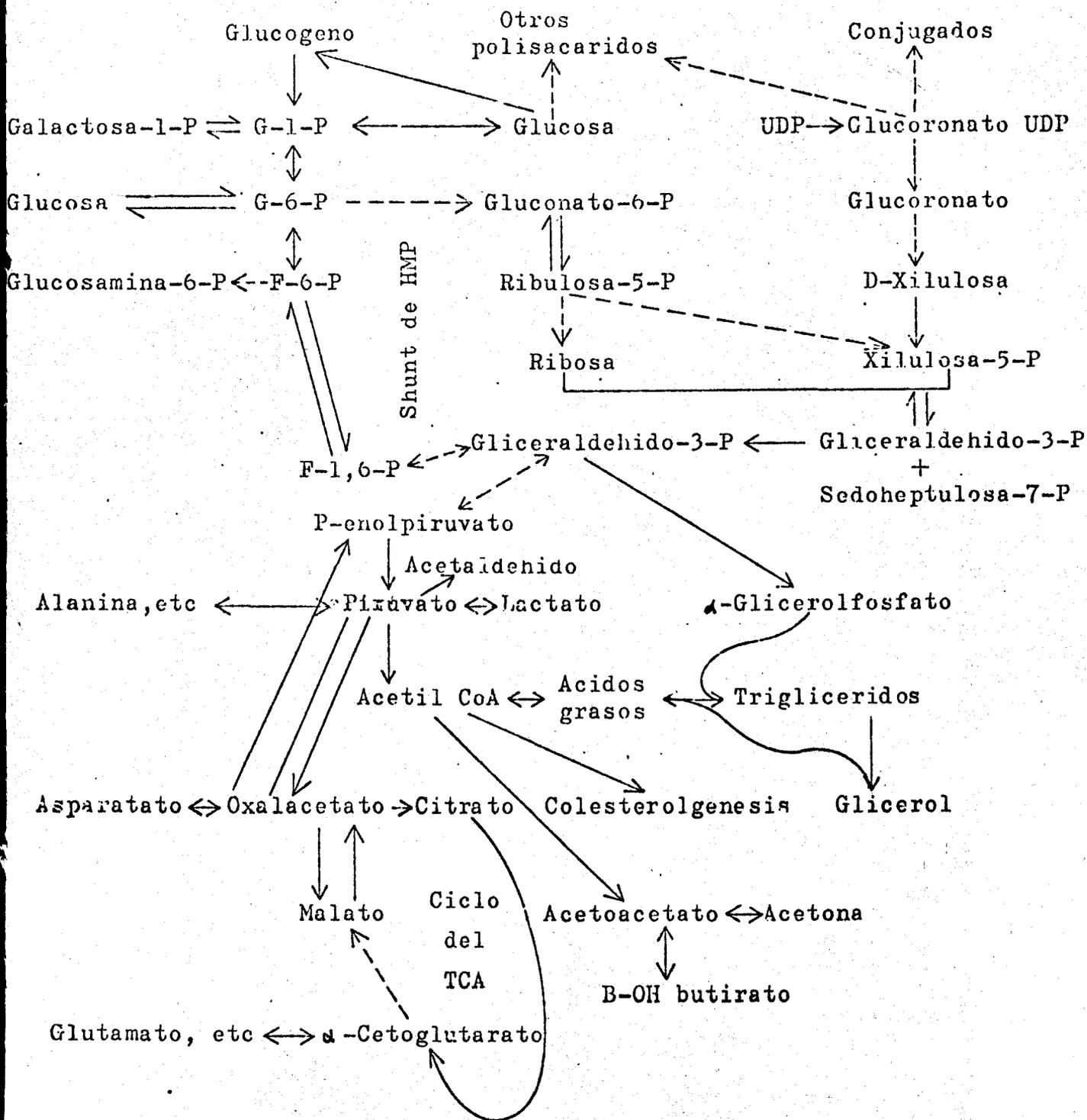
S A N G R E

T E J I D O
E X T R A H E P A T I C O



CUADRO Nº 4

GLUCOGENESIS Y GLUCOGENOGENESIS



Via del Glucoronato

Metabolismo de los lipidos

en hidrógenos, tales como los ácido grasos y el colesterol. Se conoce también con los nombres de vía de la hexosamonofosfato, de la pentosa - fosfato y oxidativa directa.

4º.- Vía del ácido glucorónico, como resultado de los estudios de la biosíntesis del ácido L - ascórbico (118, 119, 120) y L - xilulosa, azúcar que típicamente se encuentra en familiares con pentosuria (121). Esta vía del ácido glucorónico se efectúa a partir de la formación de uridindifosfoglucosa (UDPG), formándose uridindifosfoglucorónico (UDPGA), el cual puede ser utilizado en la síntesis de polisacáridos y mucopolisacáridos (122, 123); o bien puede sumarse al ácido glucorónico utilizado para la conjugación hepática de sustancias tales como la bilirrubina y los esteróides.

El glucoronato puede transformarse posteriormente en L - gulonato, 3 - cetogulonato, D - xilulosa - 5 - fosfato y usarse en el shunts de la HMP (en la diabetes hay aumento de xilulosa).

5º.- Glucogénesis, mediante la cual la glucosa constituye glucógeno, principal forma de almacenamiento de la misma como hidrato de carbono.

6º.- Conversión en glucosa por la glucosa - 6 - fosfatasa, constituye la mayor fuente de glucosa de origen no alimentario, siendo el hígado y el riñón, los dos únicos órganos que tienen cantidades significativas de dicho enzima. Su acción es

desfosforilizar a la glucosa - 6 P, permitiendo el paso de la glucosa libre a la sangre. Su acción es inhibida por la insulina.

7º.- Metabolismo del piruvato, a partir del piruvato, punto final de la glicolisis, tras una decarboxilación oxidativa se va transformar en acetilcoenzima A y oxalacetato; constituyendo el piruvato un precursor de los dos ingredientes necesarios para el ciclo del ácido tricarboxílico.

A partir del acetilcoenzima A, se pueden seguir varias vías, de las cuales las más importantes y que van a poner en relación con el resto del metabolismo de los principios inmediatos son: (124, 125)

- a) Oxidación en el ciclo tricarboxílico.
- b) Incorporación a los ácidos grasos de cadena larga.
- c) Incorporación al colesterol.
- d) Metabolización a acetatoacetato y B - hidroxibutirato.

B) INTERCONVERSION DE HEXOSAS.-

Otro de los caminos metabólicos que puede seguir la glucosa, es la interconversión con otras hexosas, a partir de las cuales se van a sintetizar los diversos polisacáridos, componentes estructurales de las membranas y paredes celulares.

La importancia que tiene ésta vía para nuestros trabajos es lo que ha justificado que le dediquemos mayor extensión a la misma.

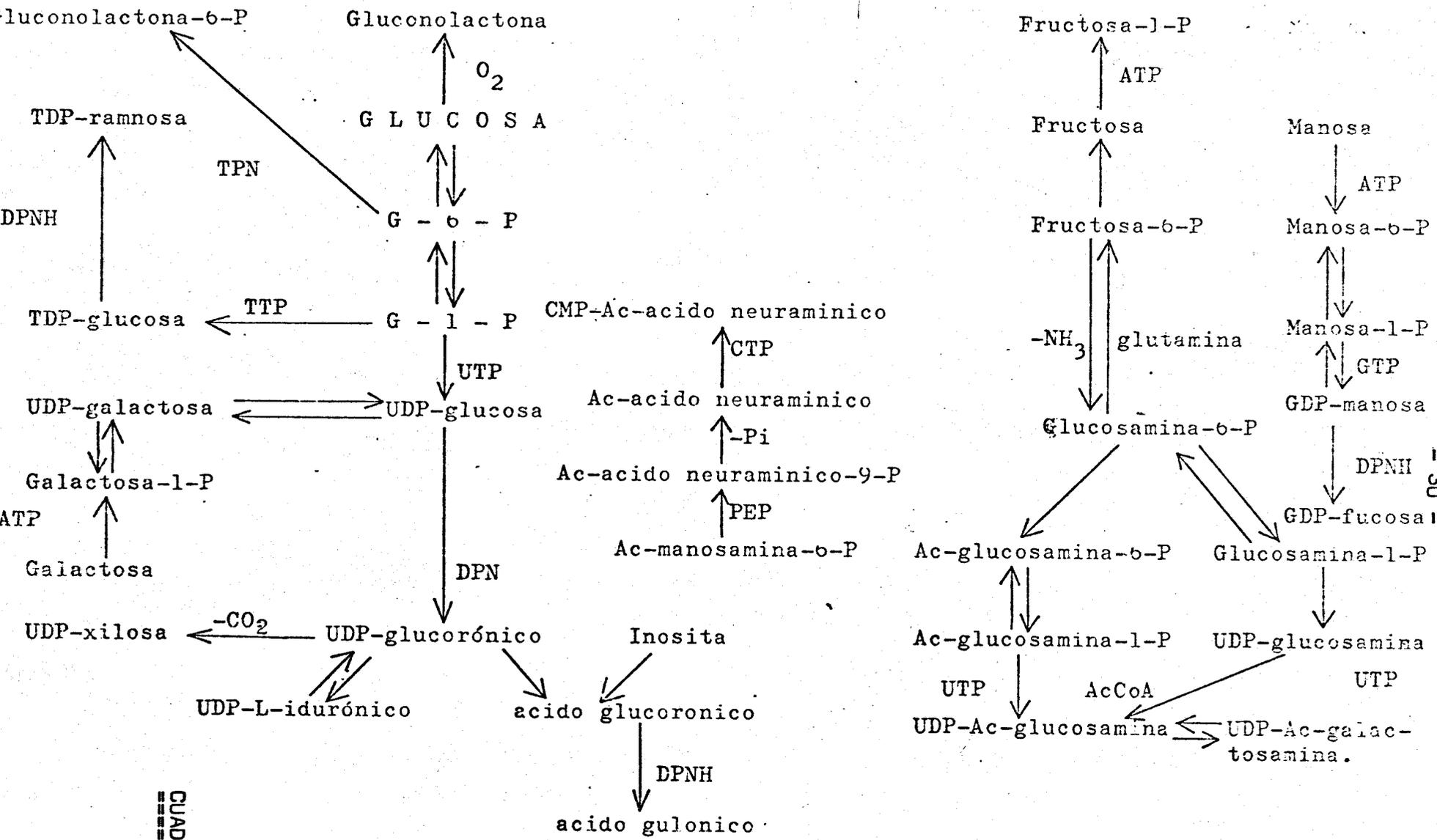
La gran diversidad de las hexosas proceden de la glucosa - 6 - fosfato, por la aplicación de un grupo sorprendentemente limitado de reacciones generales. En el cuadro adjunto (cuadro nº 6) tomado de White, puede seguirse el proceso de síntesis de algunas hexosas específicas.

Como hemos señalado todas derivan de la glucosa - 6 - fosfato, sin necesidad alguna de fragmentación o alargamiento de cadena carbonosa que permanece intacta en cada proceso (126).

Los puntos a señalar de mayor interés en estas interconversiones son:

a) Formación de ácidos urónicos, Los a. urónicos surgen de la oxidación de la uridina - difosfato - glucosa; por epimerización del ácido UDP - D - glucorónico se forma el UDP - lido-rónico.

b) Formación de la xilosa, mediante la decarboxilación



CUADRO Nº 6

INTERCONVERSION DE LAS HEXOSAS

FIG. 6

del UDP - glucorónico, formandose UDP - xilosa. Esta será utilizada con posterioridad en la formación de los xilósidos de los grupos serilhidroxílicos de la síntesis de las mucoproteínas.

c) Formación de los amino - azúcares, se forman por transferencia del grupo amida de la glutamina a ésteres 6 - fosfatos de cetosas. Posteriormente estos amino azúcares son acetilados utilizando la acetil coenzima A como agente de acetilación siendo catalizada la acetilación por enzimas específicas para cada amino azúcar.

d) Formación de ácidos sialicos, mediante condensación aldólica.

CONTROL DE LA INTERCONVERSION DE HEXOSAS.-

Principalmente la síntesis de las demás hexosas a partir de la glucosa, va dirigida hacia la producción de compuestos necesarios para la síntesis de los polisacáridos. Como en otros sectores del metabolismo, muchos sino todos, de tales procesos biosintéticos, son autorregulados. La forma activa de la hexosa que se utiliza en la formación del polímero sirve de inhibidor alostérico en una etapa previa de su propia biosíntesis. Hasta ahora resultan oscuros los detalles referentes a sus enzimas, sin embargo se enumeran algunos ejemplos de este tipo de control metabólico en las bacterias (127, 128, 129, 130).

Estas reacciones estarían sometidas a una retroregulación

por los diferentes metabolitos de la glucosa (131), y parecen ser la consecuencia de la naturaleza alostérica de ciertos enzimas llaves: hexokinasa, fructosa - 6 - P - amino - transferasa, UDP - glucosa - deshidrogenasa, N - acetil - glucosamina - 22 - epimerasa, los cuales intervienen en la conversión de la glucosa en glucosamina y en ácidos glucorónico.

C) REPERCUSIONES DE LA INSUFICIENCIA DE INSULINA.-

Hemos visto hasta aquí lo ocurre normalmente en el metabolismo glucídico, vamos a revisar ahora las repercusiones que sobre el mismo va a tener la insuficiencia insulínica. Hablamos de insuficiencia insulínica, más que a una falta cuantitativa de la misma, pues dichas alteraciones las vamos a referir igualmente a aquellos casos en que aún existiendo más insulina de la que circula normalmente en sangre periférica, va a existir una mala actuación de la misma, que se va a reflejar en una alteración del metabolismo glucídico.

Las reacciones más importantes del metabolismo glucídico son:

1º.- La acción de la insulina sobre la penetración de la glucosa a través de la membrana celular.

2º.- La inducción por la insulina de la biosíntesis de la glucocinasa.

Es de hacer notar aquí, que otro enzima capaz de fosforilizar las hexosas, la HEXOKINASA, no parece estar sometida a la regulación de la insulina, según SPIRO (132), el cual seleccionó el hígado como un tejido apropiado, debido a su activo papel en la síntesis de las glicoproteínas, para la evaluación del papel de la deficiencia de insulina en la biosíntesis de glucosamina a partir de la glucosa, permitiéndole además el mismo experimento una compa-

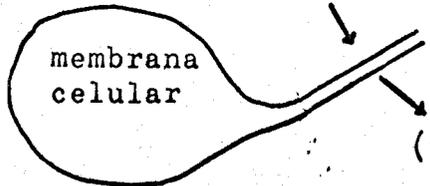
ración de la síntesis del glucógeno a partir de la glucosa con la de la hexosamina en el estado diabético, teniendo enorme interés, ya que ambas rutas metabólicas se efectúan a través de la glucosa - 6 - fosfato. Los resultados fueron distintos para el glucógeno y la glucosamina; así los pools hepático y sérico de la glucosamina fueron esencialmente los mismos en las ratas normales y diabéticas, mientras que el pool de glucógeno de las diabéticas fue marcadamente disminuido. Efectuó igualmente trabajos in vivo con radioisótopos, confirmando dichos hallazgos: así, mientras la incorporación de glucosas C - 14, en el glucógeno hepático estaba reducido (aprox. el 1 % de lo normal), la incorporación del mismo isótopo en la glucosamina, no estaba afectada.

Esta diferencia del efecto de la deficiencia de insulina observada por primera vez por SPIRO, indica que la insulina no juega el mismo papel en la regulación de estos dos caminos del metabolismo de la glucosa y que la hexosamina es sintetizada por una vía "insulin - independiente" a pesar de realizarse a través de la glucosa - 6 - fosfato.

En revancha a esta independencia de la insulina de la hexoquinasa, está sometida a una retroregulación negativa por el ATP y la hexosa - 6 - P (cuadro nº 7) que al acumularse inhibirá la fosforilización de las hexosas.

3º.- La formación del UDP - glucorónico a partir de la

(extracelular)



GLUCOSA (intracelular)

+

GLUCOKINASA hexokinasa

ATP

Ciclo de las pentosas fosfato

GLUCOSA-6-P

GLUCOSA-1-P

UDP-GLUCOSA

UDP-GALACTOSA

UDP-GLUCORONATO

UDP-XILOSA

Ciclo Embden Meyerhof

MANOSA-6-P → GDP-MANOSA

FRUCTOSA-6-P → GLUCOSAMINA-6-P (glutamina)

GLUCOSAMINA-6-P

FRUCTOSA-1-6-diP

N-ACETIL-GLUCOSAMINA-6-P

TRIOSAFOSFATOS

N-ACETIL-GLUCOSAMINA-1-P

POSFOENOLPIRUVATO

UDP-N-ACETIL-GLUCOSAMINA

UDP-N-ACETIL-GALACTOSAMINA

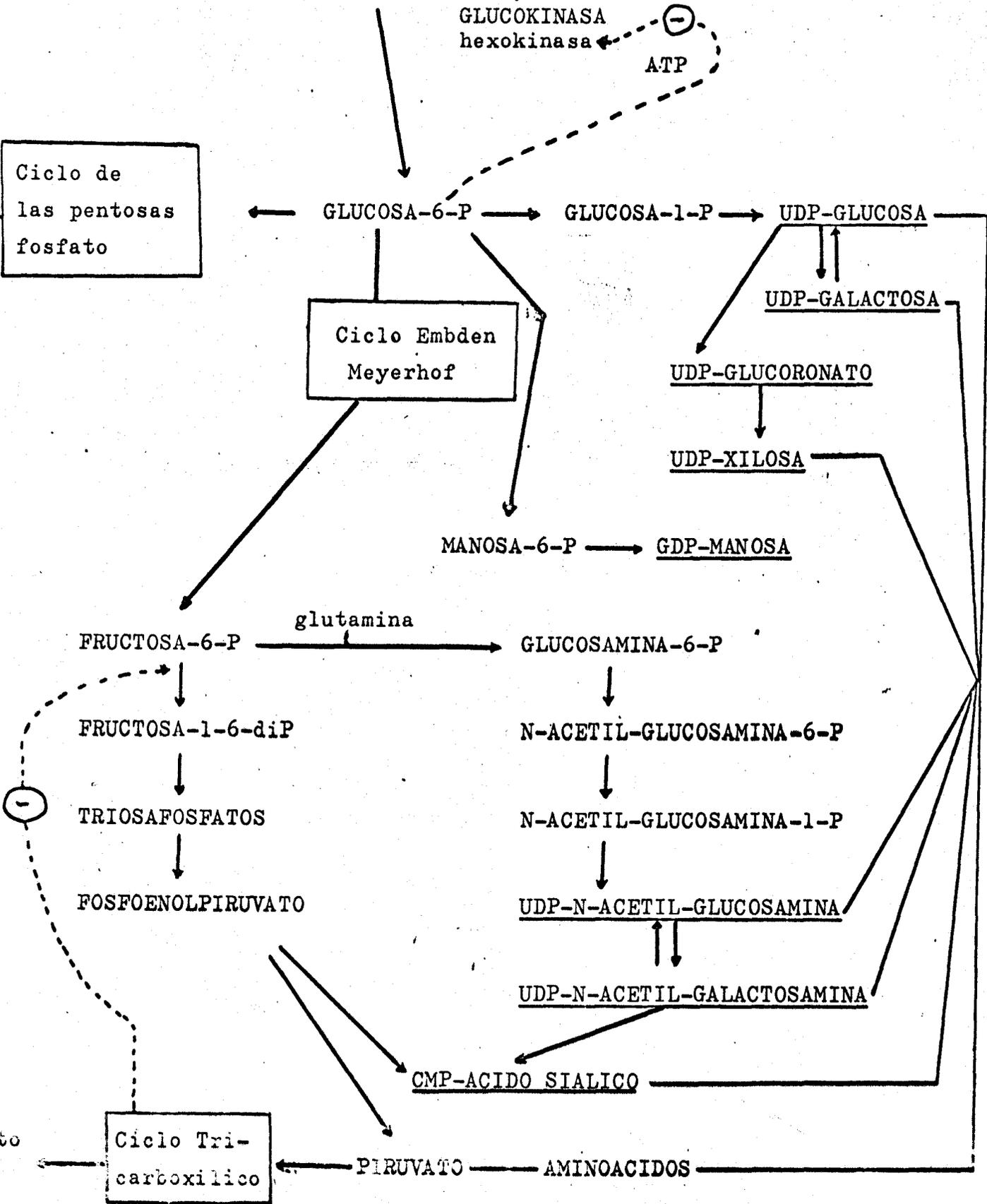
CMP-ACIDO SIALICO

Ciclo Tri-carboxilico

PIRUVATO

AMINOACIDOS

rato



UDP - glucosa, sometido a una retroregulación negativa por la UDP - xilosa.

La independencia de ésta vía del glucorónico de la acción de la insulina, fue observada por primera vez por STRAUM-FJORD, J.V. y WEST, E.S. (133). Que observaron que la síntesis del a. ascorbico, que procede de la vía del glucorónico, es 4 ó 5 veces superior en las ratas diabéticas. Habiendo sido confirmado por WINEGRAD y SHAW, (134), que observaron que la actividad de la vía del a. glucorónico es superior en el tejido adiposo de las ratas diabéticas comparadas con las normales. Con la administración de insulina la actividad disminuye y aumenta en las ratas normales tras la administración de la hormona de crecimiento. (135) Posteriormente el mismo autor, junto con BURDEN, al estudiar el metabolismo de la L - xilulosa en pacientes diabéticos, intermedio no fosforilado de la vía del a. glucorónico, obtiene un aumento de las cifras en condiciones basales de la xilulosa, tras la administración de insulina, disminuye sus niveles y aumenta tanto en los diabéticos como en personas normales, tras la administración de STH.

4º.- La síntesis de la glucosamina gracias a la L - glutamina - D - fructosa - 6 - P - aminotransferasa. Esta aminotransferasa está sometida a una retroregulación negativa por la N - acetil - glucosamina que regula así su propia síntesis.

Los recientes trabajos de PHELPS, HARDINGHAM y WITERBUN (136), han demostrado que la actividad de dicha enzima depende

también de la relación de glucosa - 1 - P/ glucosa - 6 - P. Gracias a esta doble regulación el paso de los metabolitos (fructosa - 6 P y de la glutamina), hacia la glucosamina es muy regular lo que explica la gran constancia del pool intracelular de glucosamina. Esta doble regulación podría explicar la insensibilidad a la insulina de las primeras vías de síntesis de las glicoproteínas. Sin ella, tal como señala ROBERT, el diabético sería no solamente un enfermo metabólicamente grave, sino sobre todo sería una enfermedad que conduciría a múltiples malformaciones tisulares de la trama conjuntiva, a semejanza de la enfermedad de Hurler, o de otras mucopolisacaridosis.

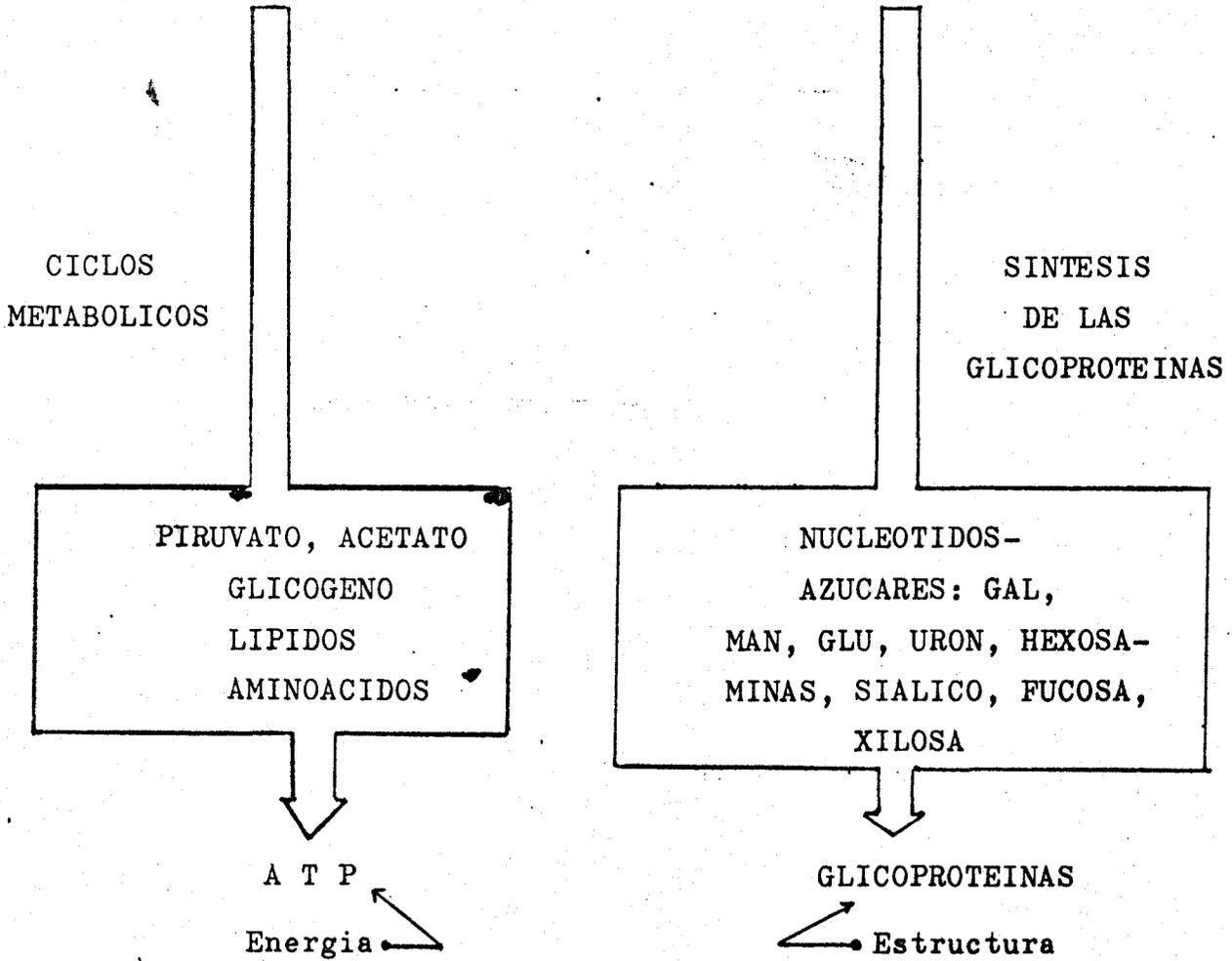
La independencia del metabolismo de las glicoproteínas con la insulina y en incremento de éste en el estado diabético, ha sido demostrado además de por las citas anteriores, por otras muchas, a todos los niveles, como por ejemplo en la secreción salivar, motivo fundamental de este trabajo que será estudiado en capítulos siguientes.

RESUMEN:

Los hidratos de carbono de la ingesta o los sintetizados por el organismo, podrán seguir dos vías metabólicas distintas (cuadro nº 8), esquema de ROBERT:

1ª.- La primera de ella que supone de un 78 a un 90 % sigue los caminos bien conocidos del ciclo de EMBDER - MEYERHOFF,

CARBOHIDRATOS
(ingeridos o sintetizados)



CUADRO Nº 8

y su posterior conexión con la rueda de los tricarbóxicos, descrita por KREBS.

2ª.- La segunda, que supone un porcentaje que varía del 2 al 30 %, vá a subvenir las necesidades hidrocarbonadas de las glicoproteínas en sus distintos componentes, vía de las hexosaminas, de los ácidos siálicos, de la fucosa y de las osas neutras.

El primero de los caminos es dependiente de la acción de la hormona pancreática, que no sólo introduce la glucosa dentro de la célula, sino que vá a regular su utilización; el turnover de estas reacciones se hace de forma muy rápida.

Sin embargo en el segundo, los distintos pasos bioquímicos se efectúan con independencia de la misma (131, 137), estando influenciados por mecanismos de retroregulación negativos a partir de los propios metabolitos formados en el curso del mismo: el turnover de las osas que utilizan la vía "insulin - independiente" es por contraste mucho más lento, como en el departamento intra como extracelular.

Al parecer un déficit de insulina (cuadro nº 9), la glucosa no podrá seguir el camino degradativo y los excedentes forzosos de éste hidrocarbonado se dirigen de forma obligada hacia la vía de las glicoproteínas, aumentando la síntesis de sus radicales glucídicos, alterando bien la cantidad o/y la calidad de las mismas. Al restaurarse por la administración de insulina la vía normal glicolítica, las glicoproteínas por tener un turnover muy len-

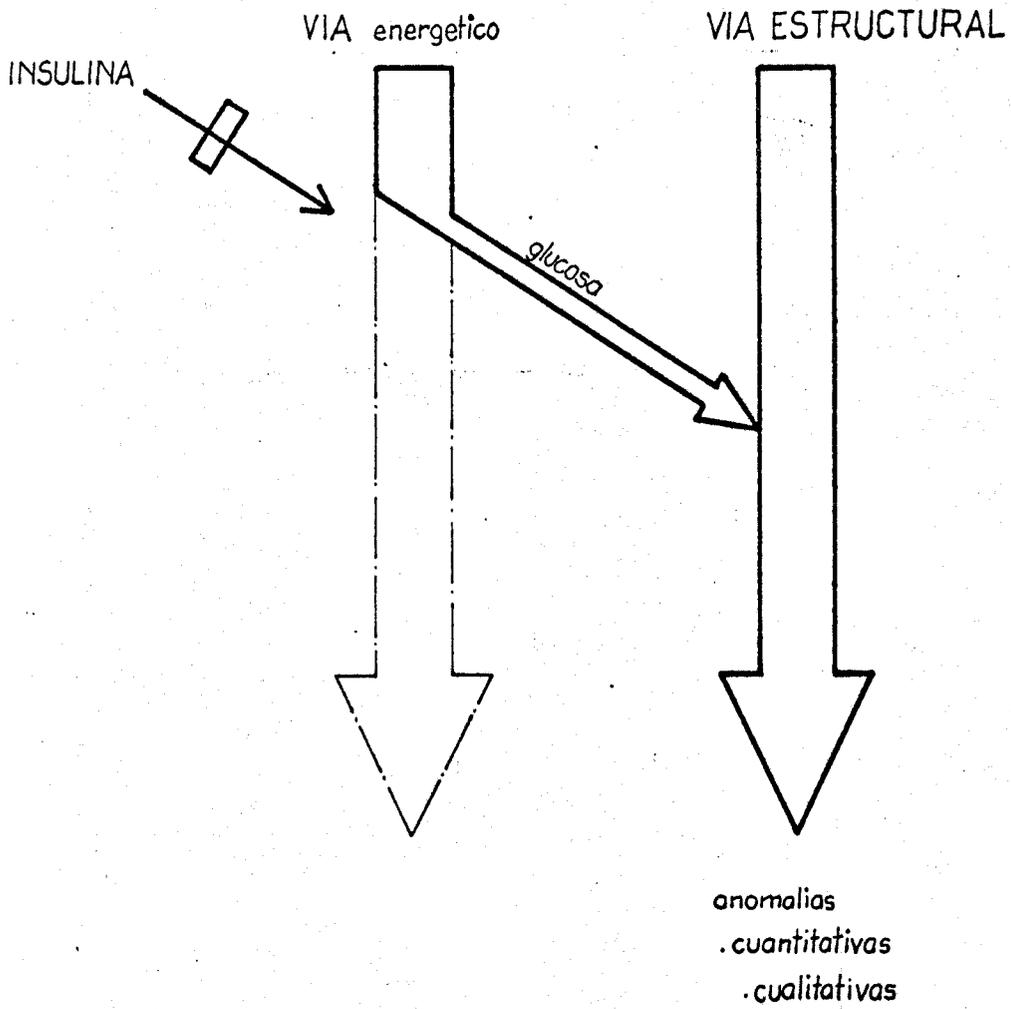


FIG. 9

to, persistirá como secuela indeleble del desequilibrio metabólico sufrido, una alteración de las glicoproteinas (138).

D) INSULINA Y SINTESIS PROTEICA.-

Brevemente comentaremos la relación existente entre la insulina y el metabolismo de los radicales protéicos de las glicoproteínas. Como muy bien señala TEPPELMAN (139), la literatura existente acerca de las relaciones entre la insulina y el metabolismo de las proteínas es muy extensa; pero no se conoce aún el exacto papel en la síntesis de las proteínas, de la insulina. Es conocido el incremento que produce sobre la síntesis protéica por una acción que es independiente del transporte de la glucosa (140), aceleración de la síntesis que puede observarse aún en ausencia de hormona de crecimiento, pero sólo llega al máximo cuando se encuentran ambas hormonas.

Para explicar la aceleración del nivel de síntesis protéica debida a la insulina, hay varias hipótesis que sólo vamos a enumerarlas:

- Aceleración del transporte de aminoácidos (141).
- Aceleración del transporte de otras sustancias como el ATP etc. (142)
- Aceleración del turnover de los compuestos fosfatados (143).
- Acción sobre la citoestructura celular (144).
- Recientemente WOOL (145), sugiere que el lugar de acción de la insulina para estimular la sín-

- tesis protéica es el ribosoma. La insulina produciría una alteración en el mismo de tal tipo que conduce a una traslación del RNA mensajero. Estableciendo la posibilidad de que la insulina pudiera producir un cambio en la conformación del ribosoma, que tenga como resultado una alteración de la unión RNA - m ó RNA - t.
- La insulina (WILLIAMS) influye en el anabolismo protéico en dos puntos importantes de la célula: las mitocondrias y los microsomas. Consistiendo sus efectos intracelulares relacionados con la síntesis proteica fundamentalmente en:
 - A - Estímulo de la fosforilización oxidativa a nivel de las mitocondrias.
 - B - Formación de uniones peptídicas a nivel de los microsomas.
 - C. - Estímulo de la síntesis del RNA, especialmente del RNA - m.

En el reciente Congreso de diabetes de Bruselas, M.P.CO-HEN, (146), estudia la incorporación de la lisina e hidroxilisina a las membranas basales de los glomérulos renales de ratas aloxánicas. La incorporación de estos aminoácidos se encuentran aumentados

tanto en las ratas normales como en las diabéticas en presencia de alta concentración de glucosa. La suma de insulina al cultivo no tuvo acción en las normales, pero incrementó la incorporación en las ratas diabéticas.

III

GLICOPROTEINAS EN LA SECRECION DE LAS GLANDULAS SALIVARES

GLICOPROTEINAS EN LAS SECRECIONES MUCOSAS.-

Las glicoproteinas son el principal componente macromolecular de las diferentes secreciones mucosas (ROBERT G.SPIRO, - - 147). Gran parte de nuestro conocimiento sobre la estructura de estos compuestos ha sido derivada de los estudios llevados a cabo sobre las glicoproteinas de las secreciones submaxilares.

La mucina submaxilar ovina, con un peso molecular de - - un millón, contiene 45% de carbohidratos (148), en peso, mientras que la porcina (149) cuyo peso molecular es de 830.000, contiene 58%. Estas glicoproteinas tienen unas características estructurales consistentes en unidades oligosacáridas, confeccionas - - primariamente de ácido siálico, fucosa, galactosa y N-acetil-Hexosamina. La unión de estas unidades de carbohidratos a las cadenas peptídicas se hace en principio por enlaces glicosídicos - - a los residuos de serina y treonina. Estos dos aminoácidos representan el 30% de los residuos totales aminoácidos y son sustituidos en aproximadamente el 60% por unidades carbohidratos.

En el siguiente cuadro, vemos el porcentaje de los distintos componentes (según GOTTSCHALK):

Siálico	22,5	- 25%
Galactosamina	13	- 14,5%
Galactosa	0,3%	
Manosa	0,5%	
Fucosa	0,4%	

Recientemente hay varias comunicaciones de glicoproteínas sulfatadas, aisladas de las glándulas submaxilares - - - (150). Estos compuestos contienen galactosa y hexosamina (Glucosamina y galactosamina) así como cantidades variables de -- ácido siálico, fucosa y ésteres sulfato, pero están libres de ácidos urónicos. Su alto contenido en serina y treonina sugiere que el carbohidrato está unido al péptido a través de estos - aminoácidos (151,152,153).

La función más obvia de las glicoproteínas de las secreciones mucosas es aumentar la viscosidad de estas, así como ejercer de manto protector y lubricante. En las glicoproteínas de la glándula submaxilar ovina, las cargas negativas del A. siálico, en las numerosas unidades disacáridas tan cercanas entre - - si, se repelen lo que ocasiona una expansión de la molécula con - un aumento concomitante en la viscosidad. Cuando el A. siálico -- se elimina por la neuroaminidasa, o su carga se elimina por titulación a pH bajo, se observa un marcado descenso en la viscosidad (154). La presencia de neuroaminidasa en algunos gérmenes patógenos, tales como el neumococo, pueden servir para eliminar los residuos de A. siálico de las mucinas bronquiales, fluidificando el manto protector y exponiendo la superficie celular.

Muchas de las mucinas tienen actividad de grupo sanguíneo y hay estructuras dadas en la glicoproteína submaxilar porcina que tiene actividad de grupo sanguíneo A, la cual depende de

la terminal α unida a un residuo de N-acetil-galactosamina. Además muchas de las mucinas son potentes inhibidores de la Hemaglutinación viral, posiblemente por poseer alto contenido en A. - siálico que está muy vecino sobre la cadena peptídica.

En la biosíntesis de las mucinas, se ha demostrado que el ácido salicílico tiene un efecto inhibitor de la síntesis de las glicoproteínas, causando un descenso en la incorporación de la radioactividad en los constituyentes aminoazúcares: glucosamina - galactosamina y A. siálico; así como en los ésteres sulfato, según algunos autores (155).

Según HEREMANS (156) las mucinas salivares son más -- importantes en la saliva sublingual, menos en la submaxilar y -- menos aún en la parotídea. Las viscosidades son:

Sublingual	13,4
Submaxilar	3,4
Parotídea	1,5

para un total en la saliva completa de 2,9 (157).

La principal mucina submaxilar ha sido estudiada en -- bovinos, ovinos y porcinos (158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166) 66% son carbohidratos, de los cuales la mitad es A. siálico y la -- otra mitad hexosamina (galactosamina). Estos carbohidratos de la sialomucina serían numerosas cadenas cortas de grupos pros-- téticos unidas al esqueleto polipeptido por medio de hexosamina

y teniendo A. siálico en la posición terminal.

Según BETTELHEIM y DEY (158), la repulsión electroestática entre estos residuos de A. siálico tan estrechamente vecinos, es uno de los factores que confieren su característica -- rigidez a la forma de esta molécula de mucina submaxilar bovina. Perteneciendo a su posición terminal el A. siálico de la mucina submaxilar, es degradado rápidamente por la neuroaminidasa.

La mucina submaxilar forma complejos insolubles, llamados " coagulos de mucina " con toda clase de proteínas, dependiendo del pH y del estado iónico. El Status de ionización de los residuos del A. siálico, es el factor determinante de estas reacciones. Una de las consecuencias de esta tendencia de formar complejos, es que en la electroforesis de papel la mucina submaxilar no migra no exhibe su movilidad electroforética. No obstante en electroforesis libre, a pH alcalino, migra más rápido que la albúmina.

Siendo de una estructura relativamente simple comparada con otras glicoproteínas, la mucina submaxilar ha resultado ser provechosa para el estudio de la biosíntesis de las cadenas prostéticas carbohidratos en general.

Los aspectos histológicos, citoquímicos (167, 168, 169 - 170), inmunocitoquímicos (171, 172, 173, 174, 175) y a la microscopía electrónica (176) de su secreción por el epitelio glandular han sido bien investigados. En los carneros, la mucina sublingual difiere en composición de la mucina submaxilar, pues en --

la sublingual hay menos ácido siálico y más hexosa y fucosa que en la submaxilar (177). Las sustancias de los grupos sanguíneos han sido conocidas y se sabe que se dan en la submaxilar y sublingual, pero no en la saliva parotidea (178,179,180,181). Su lugar en el espectro salivar proteínico no es bien conocido. Se ha demostrado por HOROWITZ y COL. (182), que la mucinabovina submaxilar, así como los glicopeptidos, derivan por degradación enzimática de otros cuerpos, poseen determinantes antigénicos del grupo sanguíneo bovino J. Dos posibles imbrincaciones de las mucinas salivares en patología han sido discutidas en la bibliografía -- una hipótesis es que la neuroaminidasa producida por la flora bacteriana de la boca, puede secretar A. siálico de las mucinas salivares, por degradación, y este proceso ha sido avelado por un papel de las placas dentales (183); en segundo término, las -- mucinas salivares, así como todas las mucinas de secreciones del -- cuerpo, han sido sospechosas de ser cuantitativamente anormales, -- como en las enfermedades genéticas (fibrosis quística del páncreas, mucoviscidosis) en el caso de las mucinas salivares no -- hay alteraciones cualitativas hasta hoy.

PROTEINAS PLASMATICAS QUE HAY EN LA SALIVA HUMANA.-

Han sido estudiadas muy bien por métodos inmunológicos y radioactivos (184,185,186,187,188,189,190,191,192,193). Se -- han identificado: Pre-albúmina, Albúmina, α_1 - glicoproteína ácida, α_1 - antitripsina, ceruloplasmina, α_2 -macroglobulina, transfe-

rrina, β -lipoproteína, IgA, IgM e IgG. El fibrinógeno ha sido notado por algunos (194) pero negado por otros (195).

PROTEINAS DE LA SALIVA.-

Sin significación definida aun.

Con la ayuda de los antisueros contra la saliva y contra el plasma humano, un número de proteínas específicamente salivares pueden ser demostradas por inmunoelectroforesis (185, 191-196). La más fuerte o evidente de las líneas de precipitación - corresponde a la amilasa salivar. En líneas menos evidentes ha sido identificada la proteína que se une al hierro, llamada lactoferrina (191), esta proteína es una proteína más de las proteínas menores que tiene la saliva, con una movilidad de α_2 -globulina. Un segundo componente de este grupo, de las α_2 -globulina, llamado el mucosal- α_2 -globulina (191), ha sido también identificado en el moco rectal, mientras un tercero, llamado salivar α_2 -globulina es probablemente común a la saliva y al moco bronquial (197). También existe una salivar α_1 -globulina, sobre la que no se conoce nada.

La saliva submaxilar (pero no parotidea) contiene una proteína curiosa, con una distribución bimodal, en las áreas α_1 y α_2 globulina, descrita primero por ELLISON y Col. (185) y por GABL (196) y que ha sido dividida en dos componentes por la cromatografía (191); si esta proteína tiene reacciones cruzadas

con algún material de movilidad electroforética lenta (196), y si la última corresponde a la proteína llamada componente catodal por MASSON y Col. permanece como pregunta abierta.

La saliva también contiene un factor que se une a la vitamina B 12, pero que no es idéntico al factor intrínseco -- (198,199), se llama el R - enlazador, así como un factor capaz de estimular al tejido nervioso. La relación de estos componentes con los constituyentes salivares se desconoce.

Los métodos que recomiendan para la obtención de saliva son: bolas de parafina, ó con pincelaciones de A. acético al 1 - 3 %, ó A. cítrico (limón) y obteniendo la saliva mezclada, pipeteando de la boca (200). También se puede obtener la saliva de cada una de las glándulas separadamente: para extraer saliva parotídea, se une la copa de LASHLEY (201), que se une a la salida del conducto de Steno; existiendo varios modelos (202, 203). La sublingual y la submaxilar pueden estudiarse separadamente por medio de un aplicación descrita por SCHNEYER (204). La canalización de los conductos de Steno y Warton (205) es -- menos frecuente. Los últimos métodos para la extracción de saliva han sido revisados por KERR (206).

Tomando las influencias estimuladoras de la comida, el olfato y la irritación local, la cantidad total de saliva ha sido evaluada en 0,8 c.c./ minuto. Las contribuciones de la paró-

tida, submaxilar y sublingual, son : 20, 60 y 20 % respectivamente (205).

El contenido proteico de la saliva total mezclada, está situado entre 100 y 300 mgr. / 100 c.c. que son frecuentemente modificados por la estimulación. La cantidad total de proteínas salivares por día, puede llegar a 2,5 gr. ó más.

IV

JUSTIFICACION

JUSTIFICACION DEL PRESENTE ESTUDIO.-

Los primeros trabajos sobre glicoproteínas y las aportaciones aparecidas recientemente en la bibliografía mundial, - sobre todo en ésta última década, encaminadas a la comprobación de la tasa de glicoproteínas en los diferentes estados patológicos, nos han impulsado a una exploración sistemática de las mismas (29,30,33,81 bis,138), que nos permita un estudio en los distintos frentes de la enfermedad, como pueden ser : etiopatogénico, fisiopatológico e inclusive pronóstico - evolutivo.

Constantes comunicaciones se vienen sucediendo bajo estos aspectos, aunque no estén totalmente desvelados. Por ello hemos querido hacer nuestra aportación a éste apasionante, complejo y adolescente aún, capítulo de las glicoproteínas con el presente estudio llevado a cabo en la diabetes mellitus, y concretamente en la secreción salivar de glicoproteínas en estos enfermos.

Son varias las aportaciones aparecidas sobre la determinación de glicoproteínas en la secreción salivar de animales de experimentación (bovinos, ovinos y porcinos) y muy escasas las comunicaciones sobre la tasa de glicoproteínas en la saliva del hombre sano. Pero en cambio, sobre la cantidad y cualidad de las glicoproteínas que segregan las glándulas salivares en el estado diabético, no hemos encontrado ninguna aportación, a

pesar de la numerosa bibliografía mundial revisada.

Este hecho, lejos de desanimarnos nos ha espoleado - aún más en nuestro deseo investigador, uniendo al rigor y a la exactitud del método, nuestra condición de clínicos, tan bella y fácilmente inculcada por nuestro máestro, durante el dilatado tiempo de permanencia a su lado y a la cabecera de los enfermos.

V

PLANTEAMIENTO

PLANTEAMIENTO.-

Gran parte de nuestros conocimientos sobre la estructura de las glicoproteínas, han derivado de los estudios llevados a cabo en las secreciones mucosas y más concretamente en la secreción salivar. Hecho éste que nos invitó a incidir en su estudio .

Nuestra inquietud científica, junto a la curiosidad por conocer los senderos todavía ocultos en la correlación Glicoproteínas - Diabetes, nos han impulsado a escoger al compartimento salivar para nuestras determinaciones.

Una serie de interrogantes afluyeron a nuestra mente:

¿ Existe alteración de la tasa de glicoproteínas en la saliva de éstos enfermos ?.

Si es así ¿ Qué componentes del espectro glusídico -- (hexosas neutras, hexosaminas, ácido siálico, fucosa) estarían más ó menos alterados ?

¿ Existe relación entre las determinaciones llevadas a cabo en el compartimento sérico y en el compartimento salivar ?.

Estas interrogantes, transplantadas a la Clínica nos hicieron el siguiente planteamiento :

Comprobar si la administración de Insulina ó de Anti-diabéticos orales, tendrían relación con los resultados obtenidos.

Comprobar si la tasa de Glucemia basal influiría en la secreción salivar de glicoproteínas.

Comprobar si los diabéticos que tienen Glucosuria tienen mayor tasa de glicoproteínas en la saliva, y si la tasa de aquella es proporcional a la de éstas.

Comprobar si el tiempo de evolución de la Diabetes condicionaría los resultados.

Las determinaciones a valorar fueron las siguientes :

- Hexosas neutras: por constituir el componente porcentual mayor de las glicoproteínas. Se pueden considerar sus variaciones como paralelas a las de aquellas.
- Hexosaminas: por su posición en el engarce del carbohidrato y en los puntos de ramificación del mismo, nos permitiría comprobar si el grupo prostético aumentaría su arborización ó su engarce a la proteína.
- Acido siálico: por ser siempre terminal en la molécula azucarada. Es el azúcar que más personalidad confiere al carbohidrato y es el que da la viscosi-

dad a la saliva.

- Fucosa: es el último de los componentes del grupo prostético, con parecida significación que el anterior.

Los valores obtenidos se estandarizarían estadísticamente , según las normas vigentes en la investigación universal y de cada serie se obtendrían :

- Valor medio.
- Varianza.
- Desviación standard.
- Coeficiente de varianza.
- Varianza / nº de casos.
- Error standard.
- La significancia estadística : considerando $P < 0,01$.

VI

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL.-

Hemos escogido para nuestro estudio :

- a - Un grupo de 31 enfermos afectos de Diabetes Mellitus, unos ingresados en el Hospital Universitario de San Pablo y otros vistos en la Consulta Ambulatoria del Policlínico, que dirigía hasta su reciente fallecimiento el Prof. D. J. León Castro, y
- b - Otro grupo de 12 individuos normales, de distintas edades.

A todos los pacientes, después de hacerle una detenida Historia Clínica, se les practicaba una determinación de Glucemia - Basal, Glucosuria y Acetonuria, previamente a la extracción salivar.

La extracción salivar se practica con un ayuno al menos de 12 horas, tanto para la serie diabética como para los individuos normales ó serie patrón.

Las edades de los pacientes diabéticos, oscilan entre 6 y 77 años.

El tiempo de evolución de la diabetes, entre 1 mes y 38 años, de los cuales 16 pacientes son diabéticos con más de 5 años de evolución y 15 con menos de 5 años.

De estos 31 enfermos, 13 están sometidos a tratamiento

insulínico, y 18 sometidos a tratamiento con antidiabéticos orales y dieta.

Y también de estos 31 enfermos, 8 tienen la glucemia basal por encima de 200 mgr %, y 23 por debajo de 200 mgr %.

20 enfermos tienen glucosuria durante la extracción salivar y 11 no la tienen.

METODOS .-

- De extracción salivar.
- De laboratorio.

METODO DE EXTRACCION SALIVAR.-

Dentro de los métodos de extracción salivar (revisión de KEER, 206), hemos considerado más asequible y práctico el siguiente :

Tras enjuagar la cavidad bucal con suero fisiológico y secar, se pincelan las salidas de los conductos de las glándulas salivares (Steno, Warton), así como la punta de la lengua con una solución de A. acético al 3 % (DE MATTIS), obteniéndose en breve tiempo abundante saliva mezclada que se extrae del suelo de la boca mediante pequeña sonda y aspiración. Son suficientes de 2 a 3 c.c. de saliva.

Seguidamente, y como quiera que la saliva así obtenida, contiene abundante moco y residuos celulares, en tubo de ensayo se centrifuga. Se obtiene de ésta forma la "porción acuosa" de la saliva, limpia, transparente, fácilmente manipulable y apta para la determinación de glicoproteínas en la misma.

Este hecho, de centrifugar la saliva y desprejar el moco, hay que tenerlo en cuenta al final, en la valoración de los resultados, ya que las cifras en % obtenidas en la "porción acuosa" de la saliva, difieren de las obtenidas en la saliva total, con moco, pues son lógicamente menores. Es obvio decir que al estandarizar el método, tanto para la serie patrón como para la serie diabética, los resultados pueden tener una diferencia cuantitativa, pero no cualitativa.

METODOS DE LABORATORIO .-

- I - DETERMINACION SALIVAR DE HEXOSAS NEUTRAS.
- II - DETERMINACION SALIVAR DE HEXOSAMINAS.
- III - DETERMINACION SALIVAR DE ACIDOS SIALICOS.
- IV - DETERMINACION SALIVAR DE FUCOSA.

.

I - DETERMINACION SALIVAR DE HEXOSAS NEUTRAS.-

Las hexosas neutras unidas a proteínas, son valoradas - por el método colorimétrico del triptófano (BADIN y JACKSON , SHETLAR y Col., 207,208).

El principio del método se basa en que las proteínas salivares son precipitadas con alcohol etílico; los osipolisacáridos no amínicos unidos a las proteínas reaccionan en caliente - con el ácido borosulfúrico, en presencia del triptófano, dando compuestos de coloración verde - oscuro. Dicha coloración es estable durante 2 horas.

Reactivos :

- Alcohol etílico absoluto.
- Acido borosulfúrico : 50 gr. de ácido bórico, 770 c.c. de a. sulfúrico y 230 c.c. de agua destilada.
- Solución acuosa de triptófano al 1 %, preparada extemporaneamente con agua hirviente. Se conserva en frigorífico durante una semana.
- Standard de manosa : Se disuelven 100 mgr. de manosa en 100 c.c. de agua destilada, (1 c.c. = 1 mgr.). Para la utilización de ésta solución se toma 1 c.c. y se añaden 19 c.c. de agua; ó sea solución de manosa al 1/20. Se conserva en frigorífico.

Procedimiento :

La prueba se realiza seguida paralelamente a una solución standard de manosa al 1/20.

Problema: en tubo esmerilado se ponen:

- 0,2 c.c. de saliva.
- 10 c.c. de etanol absoluto.
- Se mezclan con varilla de vidrio. Se deja reposar y se centrifuga durante 15 minutos, a 4.000 r. p. m. .
- Se decanta el líquido sobrenadante y se hace gotear el tubo sobre papel de filtro.
- Al precipitado así obtenido, se le añade

1 c.c. de agua destilada y se agita.

Standard : en tubo esmerilado se pone 1 c.c. de standard de manosa al 1/20.

Blanco : en tubo esmerilado se pone 1 c.c. de agua destilada.

Reacción colorimétrica:

Se colocan los tubos en agua helada, añadiendo lentamente 7 c.c. de ácido borosulfúrico y se deja reposar durante 5 minutos, al cabo de los cuales se añade 1 c.c. de la solución al 1 % de triptófano. Se mezcla con varilla de vidrio que se ha dejado en el mismo tubo hasta el final de la prueba, ésta agitación es fundamental para la perfecta reacción del borosulfúrico y el triptófano. A continuación se ponen los tubos en baño María hirviendo durante 20 minutos, repitiendo la agitación a los 10 minutos con las mismas varillas de vidrio. A continuación se ponen de nuevo en agua helada durante otros 5 minutos, para luego dejarlos a t^a ambiente durante 30 minutos.

Lectura :

Se realiza en espectrofotómetro PYE - UNICAM a 520 mμ, contra el blanco de agua, leyendo las absorciones del problema y del standard.

Cálculo :

Siguiendo la ecuación que a continuación exponemos :

$$\frac{P}{S} \frac{520}{520} \cdot 100 = \text{mgr. \% de glicoproteinas expresados}$$

en polisacáridos no aminados.

Advertencia : La vidriería empleada debe ser lavada perfectamente con mezcla sulfoorómica, enjuagada con agua destilada y perfectamente secada.

II.- DETERMINACION SALIVAR DE HEXOSAMINAS.-

Hemos seguido la técnica original de ELSON y MORGAN (209), modificada por nosotros en algunos detalles.

Principio : En medio alcalino y al calor, la acetil-acetona produce con las osaminas liberadas, por previa hidrólisis ácida con ClH, unos cromógenos que por condensación con el reactivo de Ehrlich, permite la dosificación colorimétrica de osaminas.

Reactivos :

- Etanol al 95 %.
- Acido clorhídrico 3 N.
- Hidróxido sódico 3 N.
- Reactivo de acetilacetona: debe ser preparado en el momento de su utilización mediante la adición de --

1 c.c. de acetilacetona a 50 c.c. de carbonato sódico
0,5 N.

- Reactivo de Ehrlich:

- Paradietilaminobenzaldehido . . 0,8 gr.
- Metanol puro 30 c.c.
- ClH concentrado 30 c.c.

- Standard de glucosamina : Glucosamina hidroclicrica ,
disuelta en agua destilada a una concentraci3n de --
0,06 mgr. / c.c. .

Procedimiento:

En tubos esmerilados introducimos :

- 0,2 c.c. de saliva.
- 5 c.c. de etanol absoluto.

Se agitan y centrifugan durante 15 minutos a 4.000 -
r. p. m. , a fin de producir la precipitaci3n protei-
ca correspondiente.

- Decantaci3n y suspensi3n de nuevo del precipitado -
otros 5 c.c. de etanol. Mezclar y volver a centri-
fugar durante el mismo tiempo y revoluciones. Nueva
decantaci3n para finalmente disolver el precipitado
en 1 c.c. ClH 2N.

- Se tapan los tubos herm3ticamente y se ponen en --
baño Marfa hirviente durante 4 horas seguidas.

- Al t3rmino de 3sta hidr3lisis 3cida, es vertido el

contenido en tubos graduados, en los que el hidrolizado será neutralizado con NaOH 3 N, hasta que se haga alcalino al tornasol. Llevar á 5 c.c. con etanol al 95 % y mezclar por inversión. De ésta mezcla extraemos 1 c.c. que colocamos en otro tubo también graduado y con tapón esmerilado, al que añadimos 1 c.c. de reactivo de acetilacetona, que hemos preparado en ese momento. Mezclar.

- Se prepara entonces un blanco constituido por :

- 1 c.c. de agua destilada.

- 1 c.c. del mismo reactivo de acetilacetona.

- Y un Standard constituido por:

- 1 c.c. de standard de glucosamina.

- 1 c.c. del mismo reactivo de acetilacetona.

- Mezclar.

- Se tapan fuertemente los tubos con sus tapones esmerilados correspondientes y se colocan en baño María hirviente durante un tiempo exacto de 15 minutos, al final de los cuales serán enfriados en agua corriente.

- Añadir a cada tubo 5 c.c. de etanol al 95 %, mezclando inmediatamente por inversión. A continuación añadi-

mos cuidadosamente 1 c.c. de reactivo de Ehrlich.

- Volver a mezclar.
- Finalmente llevarlo hasta 10 c.c. con etanol al 95 %.

Lectura :

Tras dejar los tubos durante 30 minutos a la tª ambiente, efectuamos la lectura contra el blanco preparado, a 530 mμ de longitud de onda.

Cálculo :

Mediante la fórmula siguiente:

$$\frac{P_{530}}{S_{530}} \cdot 1,25 = \text{mgr. de hexosaminas que hay en 100 c.c. de saliva.}$$

DETERMINACION SALIVAR DE ACIDO SIALICO.-

Se ha seguido el método del resorcinol, según la metodología propuesta por CABEZAS y VAZQUEZ PORTO (210).

El principio del método implica la precipitación de las glicoproteínas de la saliva por el etanol al 95 %, a una tª de 0º C., hidrólisis y la reacción del ácido N - acetilneuramínico por un reactivo de ClH - Cúprico - Resorcinol ; extracción del compuesto coloreado por el acetato de butilo y la medida de la intensidad del color a 580 mμ, en un espectrofotómetro PYE - UNICAM.

Reactivos :

- Solución salina de ClNa al 0,9 %.
- Etanol al 95 %.
- Reactivo de resorcinol : Solución madre de resorcinol al 2 % en agua destilada (conservada a 4° C). Se descarta si se colorea.
- La solución de trabajo se prepara del siguiente modo:
 - Acido clorhídrico concentrado : 80 c.c.
 - Solución de $SO_4Cu. 5 H_2O$ 0,01 M, 0,25 c.c.
 - Solución madre de resorcinol, 10 c.c.
 - Agua destilada, hasta 100 c.c..

Esta solución debe prepararse no más de 4 horas antes de su utilización. Es estable una semana si se conserva a 4° C.

- Reactivo blanco: preparado como la solución de trabajo pero sin resorcinol.
- Reactivo de acetato de butilo : acetato de butilo al 98 - 100 % mezclado con n-butanol al 85/15.
- Solución patrón de ácido N - acetilneuramínico -- (A.N.A.N.) en una concentración de la mgr. por c.c. Se conserva en frasco de plástico a 0°C.

Procedimiento :

La saliva se diluye al 1/4 con la solución salina y

0,6 c.c. de ésta, se añaden gota a gota a 10 c.c. de etanol al 95 % que se ha mantenido en un baño de agua helada.

- La mezcla se agita suavemente, dejándola reposar durante 5 minutos y se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos.
- Se decanta con cuidado el sobrenadante y el precipitado se lava con 10 c.c. de etanol al 95 %.
- Se centrifuga el tubo una vez más, de igual forma y el sobrenadante vuelve a decantarse. Se invierte el tubo sobre el papel de filtro, a la tª del laboratorio, hasta que el precipitado se deseque.
- Luego se añaden 2 c.c. de agua destilada al precipitado y se agita suavemente hasta que se disuelva.
- Se colocan 2 c.c. de la solución patrón de A.N.A.N., en otro tubo de centrifuga.
- Se añaden 2 c.c. del reactivo de resorcinol de trabajo a los tubos desconocidos y a los tubos patrones. En el último tubo desconocido se agregan 2 c.c. del reactivo de "resorcinol blanco"
- Tras la agitación, todos los tubos se sitúan en un baño de agua a 108 ° C. (agua saturada con ClNa), en el que permanecen 11 minutos y después de agitar los tubos suavemente un par de veces, se enfrían con rapidez, metiéndolos en un baño de hielo.
- A continuación se añaden 5 c.c. de reactivo de acetato de butilo.

- Se agita bien la mezcla por inversión (alrededor de 50 veces) y luego se deja en un baño de hielo durante 15 minutos en la oscuridad.
- La capa del fondo acuosa se retira con una jeringa-pipeta y la lectura se realiza inmediatamente a 580 mμ después de ajustar el espectrofotómetro con el tubo blanco.

Cálculo :

Lo efectuamos según la siguiente ecuación:

$$x = \frac{P_{580}}{S_{580}} \cdot 19,9 .$$

x : Corresponde a la concentración del problema en mgr. de A.N.A.N. / 100 c.c. de saliva.

DETERMINACION SALIVAR DE FUCOSA.-

La determinación de fucosa unida a proteínas salivares, fué determinada siguiendo el método de DISHE Y SHETTLER (211), que a continuación describimos:

- a) Añadir 0,3 c.c. de saliva a 5 c.c. de etanol al 95 % en cada uno de los tres tubos con tapón, de 15 x 150 mm. Mezclar. Lavar los lados con 5 c.c. de etanol al 95 % y dejarlo reposar 15 minutos.
- b) Centrifugar y decantar el sobrenadante, lavando el

precipitado con 5 c.c. de etanol al 95 %, volviendo de nuevo a centrifugar otros 15 minutos.

- c) Decantar el sobrenadante, invertir los tubos, dejándolos secar sobre papel de filtro. Disolver el precipitado a continuación con 1 c.c. de Na OH 0,1 N .
- d) Dejar los tubos en agua helada durante 15 minutos. Añadir 4,5 c.c. de solución de SO_4H_2 helada, tapar los tubos y mezclar por inversión. Enfriar en baño de hielo durante 5 minutos.
- e) Quitar los tapones y calentar en baño María de agua hirviente, durante tres minutos. Enfriar a continuación con agua corriente durante 10 minutos.
- f) Añadir 0,1 c.c. de reactivo de cisteína a cada tubo y mezclar inmediatamente. Dejar a t^a ambiente durante 60 minutos.
- g) Leer en espectrofotómetro a 396 y 430 m μ contra reactivo blanco.

Cálculos :

$$x = 0,02 \times 1000 \times \frac{(A_{396} - A_{430}) - (B_{396} - B_{430})}{S_{396} - S_{430}} =$$

= mgr. de fucosa / 100 c.c. de saliva.

A₃₉₆ y A₄₃₀: corresponden a las lecturas de la absorbancia (densidad óptica) de las soluciones desconocidas a 396 y 430 m μ .

B396 y B430 : son las muestras correspondientes al blanco.

S396 y S430 : corresponden a las lecturas del standard.

Reactivos :

- 1) Standard : disolver 20 mgr de fucosa en un frasco de 100 c.c. de agua destilada. Tomar 10 c.c. de -- ésta solución y diluirla a 100 c.c. . Dicha solución contendrá entonces 0,02 mgr. de fucosa / c.c. de solución. Ponerla en un tubo con tapón, al igual que los problemas y seguir desde el paso d) .
- 2) Solución de SO_4H_2 : añadir cuidadosamente 600 c.c. de ácido sulfúrico concentrado (Sp.g. 1806) a 100 c.c. de agua, agitando con varilla de vidrio.
- 3) Reactivo de cisteina : disolver 3 gr. de cisteina - ClH en 100 c.c. de agua destilada.
- 4) NaOH 0,1 N : 5,5 c.c. de NaOH al 50 % (Sp.g. 1,52) en 1.000 c.c. de agua destilada.
- 5) Reactivo blanco : utilizar 1 c.c. de agua y proceder desde el paso d).
- 6) Muestra blanco : omitir la cisteina de uno de los tubos de la muestra de saliva en el paso g). Esto es una comprobación del color en la muestra, que no se debe a la reacción de la cisteina.

VII

RESULTADOS

RESULTADOS:

Los resultados obtenidos quedan reflejados en las siguientes tablas:

- En la tabla nº I, hemos recogido las determinaciones efectuadas en el suero de doce individuos normales.

- En la tabla nº II, hemos recogido las determinaciones efectuadas en la saliva de doce individuos normales ó serie patrón.

- En la tabla nº III, que corresponde a los diabéticos en su totalidad, observamos un aumento general de todas las determinaciones, comparadas con las de la tabla nº II. Los componentes de la fracción hidrocarbonada con mayor aumento y con significancia estadística, corresponden a las hexosas neutras y a la fucosa. También se encuentran aumentados, aunque sin significancia estadística las hexosamina y el ácido siálico, por este orden.

- En la tabla nº IV, que corresponde a los diabéticos con tratamiento insulínico, seguimos encontrando gran significancia estadística en las determinaciones de fucosa y de hexosas neutras. Las hexosaminas y el ácido siálico, aunque aumentados, no tienen significancia.

- En la tabla nº V, que corresponde con tratamiento oral encontramos resultados parecidos a los de la tabla nº IV.

- En la tabla nº VI, que se refiere a los diabéticos con

glucemia basal mayor de 2 gr. ‰, la fucosa alcanza las cifras mas altas, con gran significancia estadística. Las hexosas neutras tambien la tienen. El ácido siálico se encuentra aumentado aunque no alcanza significancia.

- En la tabla nº VII, que corresponde a los diabéticos con glucemia basal menor de 2 gr. ‰, la fucosa sigue teniendo gran significancia y la cifra total de hexosa también la alcanzó. Las hexosaminas y el ácido siálico no la alcanzaron aunque también estaban elevados.

- En las tablas nos, VIII y IX, que se refieren al tiempo de evolución de la diabetes, segun sea mayor de cinco años ó menor de cinco años, encontramos que en los diabéticos con mayor tiempo de evolución estan más aumentada las hexosas neutras y la fucosa que en los de menor tiempo. Los otros resultados son similares.

- Finalmente en las tablas nos. X y XI, hemos agrupado a los diabéticos que tenían glucosuria y que no la tenían durante la extracción salivar. Nos hemos encontrado con que existe mayor aumento de hexosas neutras, fucosa y ácido siálico en los primeros en relación con los segundos.

RESUMEN:

- HEXOSAS NEUTRAS:

Todos los valores medios estan aumentados con respecto a

los patrones.

Los valores medios máximos correspondieron a las tablas nº IV (serie insulín - dependientes), nº IX (serie con más de cinco años de evolución) y nº XI (serie con glucosuria).

Los valores medios mínimos a las tablas: nº VIII, (serie con menos de cinco años de evolución), nº X, (serie sin glucosuria) y nº V (serie de contrarregulación).

Todos los valores tienen significancia estadística.

- HEXOSAMINAS:

Todos los valores medios están aumentados con respecto a la serie patrón.

Sólo en la tabla nº X, (serie sin glucosuria se alcanzó significancia). También en la tabla nº VIII, (serie con menos de cinco años), la media es también muy demostrativa.

- ACIDO SIALICO:

Todos los valores medios están aumentados con respecto a los patrones. Pero es aquí, donde estos valores medios han sido menos ostensibles. Sin significancia estadística en ninguna tabla.

Las cifras mayores han correspondido a los que tienen la glucemia basal mayor de dos gramos por mil (tabla nº VI), a los que tienen glucosuria (tabla nº XI) y a los que tienen menos de cinco años de evolución (tabla nº VIII).

Las cifras menores han correspondido a : los diabéticos

sin glucosuria (tabla nº X) y a los diabéticos con glucemia basal menor de 2 gr. ‰ (tabla nº VII).

- FUCOSA:

Aumentada de forma muy manifiesta en todos los valores medios. En todas las tablas gran significancia estadística.

Las cifras mayores han correspondido a los diabéticos con mas de cinco años de evolución (tabla nº IX), a los diabéticos con glucosuria (tabla nº XI) y a los diabéticos insulin - dependiente (tabla nº IV).

Las cifras menores han correspondido a los diabéticos con menos de cinco años de evolución (tabla nº VIII) y a los que no tenían glucosuria (tabla nº X).

Todas las determinaciones estadísticas se llevaron a cabo en una Olivetti - Programa 101, perteneciente a la Facultad de Medicina de Sevilla.

DATOS SERIE PATRON

- SANGRE -

Nº CASOS		HEXOSAS NEUTRAS	HEXOSAMINAS	A. STALICO	FUCOSA
1	C.N.	122,00	45,00	59,58	—
2	O.L.	159,00	49,40	66,69	1425
3	S.G.	122,20	49,40	52,35	983
4	V.D.	125,00	47,45	45,60	944
5	T.G.	116,00	91,50	39,33	1148
6	M.C.	133,50	59,00	41,61	—
7	R.P.	127,00	90,00	65,83	18,18
8	F.V.	103,00	62,55	56,14	1704
9	J.N.	165,00	53,15	47,02	20,72
10	J.P.	159,25	74,50	47,59	11,10
11	F.M.	153,60	84,00	63,84	19,55
12	A.M.	140,00	76,50	55,29	28,14
	X	135,462	65,204	53,406	15,97
	V	392,413	298,854	87,524	35,18
	±	19809	17287	9354	593
	C.V.	14,623	26,512	17,515	37,13
	E.S.	5,718	4,990	2,700	187

Tabla I

DATOS SERIE PATRON

- SALIVA -

Nº CASOS		HEXOSAS NEUTRAS	HEXOSAMINAS	A.SIALICO	FUCOSA
1	P.M.I.	22,50	0,14	0,30	1,19
2	F.O.M.	30,00	0,37	1,99	1,70
3	P.D.	35,50	0,28	0,34	1,27
4	C.R.P.	20,10	0,12	1,07	2,17
5	J.M.G.	39,20	0,06	0,31	1,88
6	J.M.M.	—	0,38	1,70	1,18
7	A.M.M.	34,85	0,73	1,25	2,12
8	P.C.G.	10,00	1,37	—	1,94
9	J.C.P.	36,50	0,71	2,66	2,09
10	C.D.M.	40,33	0,57	2,93	1,11
11	D.G.P.	26,80	0,45	2,23	2,59
12	J.S.M.	18,25	0,42	2,32	1,97
X		28,548	0,466	1,554	1,767
V		96,674	0,126	0,928	0,228
D.S.		9,832	0,354	0,963	0,477
C.V.		34,440	75,965	61,969	26,994
V/N		8,788	0,010	0,084	0,019
E.S.		2,964	0,100	0,289	0,137
Nº CASOS		11	12	11	12

Tabla II

Nº DE CASOS		EDAD	EVOLUC. DIABETES	TRATA-MIENTO	GLUCEMIA gr.‰	GLUCOSURIA gr.‰	ACETONA	HEXOSAS NEUTRAS	HEXOSAMINAS	AC. SIALICO	FUCOSA
1	C. E. M.	49	5	oral	1,45	Ø	Ø	32,50	0,99	1,66	13,60
2	S. P. R.	35	10	ins	2,34	76	+	61	1,66	2,80	12,48
3	J. M. M.	39	1m	dieta	1,35	Ø	Ø	51,23	2,88	1,86	13,90
4	A. S. R.	64	8	ins.	2,31	18	Ø	46,50	0,97	5,20	—
5	F. V. N.	62	5	oral	1,95	20	Ø	47	0,48	2,66	15,40
6	J. O. B.	64	3	oral	1,89	Ø	Ø	44	2,67	—	16,23
7	T. P. P.	6	1	ins	1,36	Ø	Ø	48	1,82	2,60	13,65
8	D. L.	50	8	oral	1,38	Ø	Ø	60,50	0,62	1,40	—
9	F. E. G.	44	8	ins	1,25	30	Ø	42,45	—	2,79	10,74
10	M. A. D.	68	38	ins	1,92	38	Ø	54,30	—	2,06	18,45
11	F. M. M.	70	20	ins	2,40	40	Ø	38,50	0,46	1,76	16,66
12	B. M. L.	74	6m	oral	1,48	6,4	Ø	—	0,64	—	10,43
13	M. M. M.	39	2	oral	1,23	Ø	Ø	34,80	0,47	2,43	11,54
14	M. C. A.	41	1	oral	1,30	Ø	Ø	28,25	0,42	2,59	14,97
15	M. G. R.	37	2	ins	3,00	42,5	+	56,00	1,27	5,80	15,33
16	I. N. C.	48	4,5	oral	1,97	30	Ø	45,00	0,77	3,26	20,06
17	E. B. P.	62	6	ins	2,40	50	+	48,25	1,39	2,76	15,40
18	G. R. B.	77	3	oral	1,45	Ø	Ø	20,00	0,69	1,75	8,25
19	M. D. R.	58	1m	oral	1,24	5	Ø	43,00	0,79	2,75	12,98
20	J. L. S.	69	30	ins	1,39	14	Ø	80,00	0,52	2,33	18,56
21	F. C. C.	42	6	ins	1,80	50	Ø	29,50	0,31	0,51	10,82
22	J. L. D.	28	11	ins	2,40	48	++	18,50	0,17	0,20	10,68
23	F. L. J.	51	12	oral	1,75	32	Ø	40,40	0,72	2,13	13,15
24	P. F. L.	33	8	ins	3,80	75	+	37,40	0,28	0,72	14,00
25	J. B. J.	39	15	ins	1,67	12	+	46,41	1,82	2,65	16,80
26	M. M. M.	42	4	oral	1,20	Ø	Ø	32,33	0,18	1,24	10,20
27	M. C. D.	73	15	oral	1,25	Ø	Ø	46,40	1,04	1,87	22,00
28	A. P. S.	38	1	oral	1,21	Ø	Ø	56,80	0,82	3,55	17,80
29	T. M. J.	50	5	ins	2,90	27	++	40,06	0,37	1,35	15,75
30	J. R. S.	55	6	oral	1,45	22	Ø	43,85	0,70	1,45	16,20
31	M. S. R.	65	12	oral	1,80	15	Ø	47,75	0,78	1,65	17,35

Tabla III

DATOS SERIE DIABETICOS

- SALIVA -

	HEXOSAS NEUTRAS	HEXOSAMINAS	A. SIALICO	FUCOSA
\bar{X}	44,022	0,920	2,268	14,599
V	156,646	0,464	1,428	10,478
\pm	12,515	0,681	1,194	3,236
C.V.	28,428	74,021	52,645	22,165
V/N	5,221	0,016	0,049	0,361
E.S.	2,284	0,126	0,221	0,600
Nº CASOS	30	29	29	29

- CORRELACION - Tabla III

	PATRONES		DIABETICOS		P
	X	S	X	S	
HEXOSAS NEUTRAS	28,548	9,832	44,022	12,515	> 0,0005
HEXOSAMINAS	0,466	0,354	0,920	0,681	> 0,025 < 0,0125
A. SIALICO	1,554	0,963	2,268	1,194	> 0,05 < 0,025
FUCOSA	1,767	0,477	14,599	3,236	> 0,0005

DATOS SERIE DIABETICOS

INSULIN-DEPENDIENTES

Nº CASOS	HEXOSAS NEUTRAS	HEXOSAMINAS	A. SIALICO	FUCOSA
S.P.R.	6100	1,66	2,80	12,48
T.P.P.	4800	1,82	2,60	13,65
F.E.G.	4245	—	2,79	10,74
M.A.D.	5430	—	2,06	18,45
F.M.M.	3850	0,46	1,76	16,66
M.G.R.	5600	1,27	5,80	15,33
E.B.P.	4825	1,39	2,76	15,40
J.L.S.	8000	0,52	2,33	18,56
F.C.C.	2950	0,31	1,51	10,82
J.L.D.	18,50	0,17	0,20	10,68
P.F.L.	3740	0,28	0,72	14,00
J.B.J.	4641	1,82	2,65	16,80
T.M.J.	4006	0,37	1,35	15,75
\bar{X}	46,182	0,915	2,179	14,563
V.	230,440	0,452	2,027	7,697
\pm	15,180	0,672	1,423	2,774
C.V.	32,869	7,3442	6,5305	19,048
V/N	17,726	0,041	0,155	0,592
E.S.	4,210	0,222	0,393	0,767
Nº CASOS	13	11	13	13

Tabla IV

- CORRELACION - Tabla IV

	PATRONES		DIABETICOS INSULIN DEPENDIENTES		P
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	
HEXOSAS NEUTRAS	28,548	9,832	46,182	15,180	> 0,0025 < 0,0005
HEXOSAMINAS	0,466	0,354	0,915	0,672	> 0,05 < 0,025
A. SIALICO	1,554	0,963	2,179	1,423	> 0,15 < 0,10
FUCOSA	1,767	0,477	14,736	2,774	> 0,0005

DATOS SERIE DIABETICOS

- CONTRARREGULACION -

NºCASOS	HEXOSAS NEUTRAS	HEXOSAMINAS	A. SIALICO	FUCOSA
C.E.M.	3250	0,99	1,66	13,60
M.M.M.	5123	288	1,86	13,90
A.S.R.	4650	0,97	5,20	—
F.V.N.	47,00	0,48	2,66	15,40
J.O.B.	44,00	2,67	—	16,23
D.L.	60,50	0,62	1,40	—
B.M.L.	—	0,64	—	10,43
M.M.M.	34,80	0,47	2,43	11,54
M.C.A.	28,25	0,42	2,59	14,97
I.N.C.	45,00	0,77	3,26	20,06
G.R.B.	20,00	0,69	1,75	8,25
M.D.R.	43,00	0,79	2,75	12,98
F.L.J.	40,40	0,72	2,13	13,15
M.M.M.	32,33	0,18	1,24	10,20
M.C.D.	46,40	1,04	1,87	22,00
A.P.S.	56,80	0,82	3,55	17,80
J.R.S.	43,85	0,70	1,45	16,20
M.S.R.	47,75	0,78	1,65	17,35
\bar{X}	42,371	0,923	2,340	14,628
V	104,403	0,499	1,032	13,400
\pm	10,217	0,706	1,015	3,660
C.V.	24,113	76,489	43,376	25,020
V/N	6,141	0,027	0,064	0,837
E.S.	2,478	0,164	0,252	0,914
NºCASOS	17	18	16	16

Tabla V

- CORRELACION - Tabla V

	PATRONES		DIABETICOS CONTRA- REGULACION		P
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	
HEXOSAS NEUTRAS	28,548	9,832	42,371	10,217	> 0,0025 < 0,0005
HEXOSAMINAS	0,466	0,354	0,923	0,706	> 0,025 < 0,0125
A. SIALICO	1,554	0,963	2,340	1,015	> 0,05 < 0,025
FUCOSA	1,767	0,477	14,628	3,660	> 0,0005

DATOS SERIE DIABETICOS

GLUCEMIA BASAL > 2 gr%_∞

Nº CASOS	HEXOSAS NEUTRAS	HEXOSAMINAS	A.SIALICO	FUCOSA
S.P.R.	6100	1,66	2,80	12,48
A.S.R.	4650	0,97	5,20	<u>15,33</u>
F.M.M.	3850	0,46	1,76	16,66
M.G.R.	5600	1,27	5,80	15,33
E.B.P.	4825	1,39	2,76	15,40
J.L.D.	18,50	0,17	0,20	10,68
PE.L.	3740	0,28	0,72	14,00
T.M.J.	4006	0,37	1,37	15,75
X	43,276	0,821	2,573	14,328
V	170,386	0,328	4,088	4,407
±	130,53	0,572	2,021	2,099
C.V	30,162	69,671	78,546	14,649
V/N	21,298	0,041	0,511	0,629
E.S.	4,614	0,202	0,714	0,793
Nº CASOS	8	8	8	7

Tabla VI

- CORRELACION - Tabla VI

	PATRONES		DIABETICOS GLUCEMIA BASAL > 2grs‰		P
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	
HEXOSAS NEUTRAS	28,548	9,832	43,276	13,053	> 0,01 < 0,005
HEXOSAMINAS	0,466	0,354	0,821	0,572	= 0,05
A. SIALICO	1,554	0,963	2,573	2,021	> 0,10 < 0,05
FUCOSA	1,767	0,477	14,328	2,099	> 0,0005

DATOS SERIE DIABETICOS

GLUCEMIA BASAL < 2 gr.‰

NºCASOS	HEXOSAS NEUTRAS	HEXOSAMINAS	A. SIALICO	FUCOSA
C.E.M.	3250	099	166	1360
M.M.M.	51,23	288	1,86	1390
F.V.N.	4700	0,48	2,66	15,40
J.O.B.	44,00	2,67	—	16,23
T.P.P.	4800	1,82	2,60	13,65
D.L.	6050	0,62	1,40	—
F.E.G.	4245	—	2,79	10,74
M.A.D.	54,30	—	2,00	18,45
B.M.L.	—	0,64	—	10,43
M.M.M.	34,80	0,47	2,43	11,54
M.C.A.	28,25	0,42	2,59	14,97
I.N.C.	4500	0,77	3,26	20,06
G.R.B.	20,00	0,69	1,75	8,25
M.D.R.	43,00	0,79	2,75	12,98
J.L.S.	8000	0,52	2,33	18,56
F.C.C.	29,50	0,31	0,51	10,82
F.L.J.	40,40	0,72	2,13	13,15
J.B.J.	46,41	1,82	2,65	16,80
M.M.M.	32,33	0,18	1,24	10,20
M.C.D.	46,40	1,40	1,87	22,00
A.D.S.	56,80	0,82	3,55	17,80
J.R.S.	43,85	0,70	1,45	16,20
M.S.R.	47,75	0,78	1,65	17,35
\bar{X}	44,294	0,958	2,151	14,685
V	159,235	0,530	0,518	12,680
\pm	12,618	0,728	0,719	3,560
C.V.	28,486	75,991	3 3,426	24,242
V/N	7,237	0,025	0,024	0,576
E.S.	2,690	0,158	0,154	0,758
NºCASOS	22	21	21	22

Tabla VII

- CORRELACION - Tabla VII

	PATRONES		DIABETICOS GLUCEMIA BASAL < 2gr ^s /∞		
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	P
HEXOSAS NEUTRAS	28,548	9,832	44,294	12,618	> 0,0005
HEXOSAMINAS	0,466	0,354	0,958	0,728	> 0,025 < 0,0125
A. SIALICO	1,554	0,963	2,151	0,719	> 0,05 < 0,025
FUCOSA	1,767	0,477	14,685	3,560	> 0,0005

DATOS SERIE DIABETICOS

- MENOS DE 5 AÑOS DE EVOLUCION -

NºCASOS	HEXOSAS NEUTRAS	HEXOSAMINAS	A. SIALICO	FUCOSA
C.E.M.	3250	0,99	1,66	13,60
M.M.M.	51,23	2,88	1,86	13,90
F.V.N.	4700	0,48	2,66	15,40
J.O.B.	4400	2,67	—	16,23
T.P.P.	4800	1,82	2,60	13,65
B.M.L.	—	0,64	—	10,43
M.M.M.	3480	0,47	2,43	11,54
M.C.A.	2825	0,42	2,59	14,97
M.G.R.	5600	1,27	5,80	15,33
I.N.C.	4500	0,77	3,26	20,06
G.R.D.	2000	0,69	1,75	8,25
M.D.R.	4300	0,79	2,75	12,98
M.M.M.	3233	0,18	1,24	10,20
A.P.S.	5680	0,82	3,55	17,80
T.M.J.	4006	0,37	1,35	15,75
X	41,355	1017	2,576	14,006
V	113,987	0,669	1,432	9,392
±	10,676	0,817	1,196	3,064
CV.	25,815	80,334	4,6428	21,876
V/N	8,141	0,044	0,110	0,626
E.S.	2,853	0,209	0,331	0,791
NºCASOS	14	15	13	15

Tabla VIII

- CORRELACION - Tabla VIII

	PATRONES		DIABETICOS CON MENOS DE 5 AÑOS DE EVOLUCION		P
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	
HEXOSAS NEUTRAS	28,548	9,832	41,355	10,676	> 0,005 < 0,0025
HEXOSAMINAS	0,466	0,354	1,017	0,817	> 0,025 < 0,0125
A. SIALICO	1,554	0,963	2,576	1,196	> 0,025 < 0,0125
FUCOSA	1,767	0,477	14,006	3,064	> 0,0005

DATOS SERIE DIABETICOS

- MAS DE 5 AÑOS DE EVOLUCION -

Nº CASOS	HEXOSAS NEUTRAS	HEXOSAMINAS	A. SIALICO	FUCOSA
S.P.R.	6100	1,66	2,80	12,48
A.S.R.	4650	0,97	5,20	—
D.L.	6050	0,62	1,40	—
F.E.G.	4245	—	2,97	10,74
M.A.D.	5430	—	2,06	18,45
F.M.M.	3850	0,46	1,76	16,66
E.B.P.	4825	1,39	2,76	15,40
J.L.S.	8000	0,52	2,33	18,56
F.C.C.	2950	0,31	0,51	10,82
F.L.J.	4040	0,72	2,13	13,15
P.F.L.	3740	0,28	0,72	14,00
J.L.D.	1850	0,17	0,20	10,68
J.B.J.	4641	1,82	2,65	16,80
M.C.D.	4640	1,04	1,87	22,00
J.R.S.	4385	0,70	1,45	16,20
M.S.R.	4775	0,78	1,65	17,25
\bar{X}	46,356	0,817	2,017	15,235
V	191,606	0,258	1,372	11,613
\pm	13,842	0,507	1,171	3,407
C.V.	29,860	62,056	58,056	22,360
V/N	11,975	0,018	0,085	0,829
E.S.	3,460	0,134	0,291	0,910
Nº CASOS	16	14	16	14

Tabla IX

- CORRELACION - Tabla IX

	PATRONES		DIABETICOS CON MAS DE 5 AÑOS DE EVOLUCION		P
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	
HEXOSAS NEUTRAS	28,548	9,832	46,356	13,842	> 0,0025 < 0,0005
HEXOSAMINAS	0,466	0,354	0,817	0,507	> 0,05 < 0,025
A.SIALICO	1,554	0,963	2,017	1,171	> 0,20 < 0,15
FUCOSA	1,7 67	0,477	15,235	3,407	> 0,0005

DATOS SERIE DIABETICOS

- SIN GLUCOSURIA -

Nº CASOS	HEXOSAS NEUTRAS	HEXOSAMINAS	A. SIALICO	FUCOSA
C.E.M.	32,50	0,99	1,66	13,60
M.M.M.	51,23	2,88	1,86	13,90
J.O.B.	44,00	2,67	—	16,23
T.P.P.	48,00	1,82	2,60	13,65
D.L.	60,50	0,62	1,40	—
M.M.M.	34,80	0,47	2,43	11,54
M.C.A.	28,25	0,42	2,59	14,97
G.R.B.	20,00	0,69	1,75	8,25
M.M.M.	32,33	0,18	1,24	10,20
M.C.D.	46,40	1,04	1,87	22,00
A.P.J.	56,80	0,82	3,55	17,80
X	413,46	1,145	2,095	14,214
V	1609,80	0,832	0,483	15,304
±	12,687	0,912	0,694	3,912
C.V.	30,684	79,650	33,126	27,522
V/N	14,634	0,075	0,048	1,530
E.S.	3,825	0,273	0,219	1,236
Nº CASOS	11	11	10	10

Tabla X

-CORRELACION- Tabla X

	PATRONES		DIABETICOS SIN GLUCOSURIA		P
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	
HEXOSAS NEUTRAS	28,548	9,832	41,346	12,687	$> 0,01$ $< 0,005$
HEXOSAMINAS	0,466	0,354	1,145	0,912	$= 0,0125$
A. SIALICO	1,554	0,963	2,095	0,694	$> 0,10$ $< 0,05$
FUCOSA	1,767	0,477	14,214	3,912	$> 0,0005$

DATOS SERIE DIABETICOS

- CON GLUCOSURIA -

Nº CASOS	HEXOSAS NEUTRAS	HEXOSAMINAS	A. SIALICO	FUCOSA
S.P.R.	6100	1,66	2,80	12,48
A.S.R.	4650	0,97	5,20	—
F.V.N.	4700	0,48	2,66	15,40
F.E.G.	4245	—	2,79	10,74
M.A.D.	5430	—	2,06	18,45
F.M.M.	3850	0,46	1,76	16,66
B.M.L.	—	0,64	—	10,43
M.G.R.	5600	1,27	5,80	15,33
I.N.C.	4500	0,77	3,26	20,06
E.B.P.	4825	1,39	2,76	15,40
M.D.R.	4300	0,79	2,75	12,98
J.L.S.	8000	0,52	2,33	18,56
F.C.C.	2950	0,31	0,51	10,82
J.L.D.	1850	0,17	0,20	10,68
F.L.J.	4040	0,72	2,13	13,15
P.F.L.	3740	0,28	0,72	14,00
J.B.J.	4641	1,82	2,65	16,80
T.M.J.	4006	0,37	1,35	15,75
J.R.S.	4385	0,70	1,45	16,20
M.S.R.	4775	0,78	1,65	17,35
X	45,572	0,783	2,359	14,802
V	156,029	0,223	1,955	8,522
±	12,491	0,472	1,398	2,919
C.V.	27,409	60,280	59,262	19,720
V/N	8,212	0,012	0,102	0,448
E.S.	2,865	0,109	0,319	0,669
Nº CASOS	19	18	19	19

Tabla XI

- CORRELACION - Tabla XI

	PATRONES		DIABETICOS CON GLUCOSURIA		P
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	
HEXOSAS NEUTRAS	28,548	9,832	45,572	12,491	> 0,0005
HEXOSAMINAS	0,466	0,354	0,783	0,472	> 0,05 < 0,025
A. SIALICO	1,554	0,963	2,359	1,398	= 0,05
FUCOSA	1,767	0,477	14,802	2,919	> 0,0005

VIII

DISCUSSION

DISCUSION.-

Los resultados expuestos en el anterior capítulo, nos llevan a unas conclusiones, que aún esperandolas como teníamos programado en el planteamiento efectuado, no dejan de sorprendernos ante la significativa expresión de las determinaciones efectuadas.

Se ha comprobado un aumento global de los hidratos de carbono unidos a proteínas en la secreción salivar de los pacientes diabéticos.

El incremento de los azúcares se hace a expensas de todos sus componentes. Las hexosas neutras, constituyen el componente porcentual mayor de las glicoproteínas, lo que induciría a una mayor riqueza en la arborización del carbohidrato, traducido en hexosaminas, y facultando una mayor posibilidad de radicales terminales, traduciendo así la subida de los valores de ácidos siálicos y de fucosa.

Debemos recordar aquí, que al hacer nuestras determinaciones despreciábamos el moco quitando así la viscosidad a la saliva. Como quiera que ésta viscosidad la da fundamentalmente el siálico, las cifras que obtenemos de éste, cuantitativamente no son exactas pero cualitativamente sí. Este hecho sería el que nos daría mayores variaciones entre las cifras encontradas por los diversos autores en animales de experimentación y las encontradas por

nosotros en la "porción acuosa" de la saliva, tanto en sujetos normales como en diabéticos.

En los diabéticos sometidos a tratamiento insulínico, las determinaciones salivares de hexosas neutras y de fucosa, tienen un ligero aumento en relación con los diabéticos de contrarregulación; siendo en éstos en los que son las hexosaminas y el ácido siálico los aumentados, aunque muy ligeramente. No es pues decisivo el hecho de que sea el déficit de insulina el que condicione los resultados. Interpretamos éste hecho debido a que al aparecer un déficit de hormona pancreática, la glucosa no podrá seguir el camino degradativo normal y los excedentes forzosos de éste hidrato de carbono se dirigen de forma obligada hacia la vía de las glicoproteínas, aumentando la síntesis de sus radicales glucídicos. Al restaurarse por la administración de insulina, la vía normal glicolítica, las glicoproteínas por tener un turnover muy lento, persistirán alteradas como secuela indeleble del desequilibrio metabólico sufrido.

En los diabéticos con glucosuria, se ha demostrado que las determinaciones salivares de hexosas neutras y de fucosa tienen gran significación estadística y sin significación las obtenidas de ácido siálico y hexosaminas, aunque los valores medios son apreciables. Este hecho nos hace pensar en la gran difusibilidad que en el organismo humano tienen las glicoproteínas, y considerar que no es

sólo en la excreción renal, sino en las secreciones mucosas y salivares donde se reflejan las alteraciones sufridas.

Estas comprobaciones nos confirman que la tasa de glicoproteínas en el compartimento salivar son más ó menos parecidas cualitativamente hablando, con las variantes aparecidas en el compartimento sérico ó tisular, por ejemplo, durante el curso evolutivo de la diabetes.

IX

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.-

Las conclusiones obtenidas son las siguientes :

1º.- Existe una alteración significativa de la tasa global de glicoproteínas en la secreción salivar de los diabéticos, con incremento notable en relación con los sujetos normales.

2º.- Los componentes del espectro glucídico más alterados y con mayor significación son : Fucosa, Hexosas Neutras, Hexosaminas y Acido Siálico, por éste orden.

3º.- No existe correlación entre dichas alteraciones y el carácter de insulin - dependencia de la diabetes, lo que nos dice que la síntesis de los radicales de hidratos de carbono de las proteínas, dependen de la capacidad funcional de la insulina y no de su cuantía.

4º.- No existe correlación entre las valoraciones efectuadas y el grado de compensación del estado diabético.

5º.- Existe una correlación entre las alteraciones cualitativas encontradas en las glicoproteínas salivares y el tiempo de evolución de la diabetes, sin que encontremos correlación entre dicho tiempo y las alteraciones cuantitativas.

6º.- Estimamos que la valoración de glicoproteínas en la secreción salivar del diabético, aporta datos interesantes

que pueden tener carácter semiológico, evolutivo y pronóstico, en el estudio de ésta enfermedad.

7º.- Las determinaciones que hemos efectuado en el compartimento salivar del diabético, totalmente inéditas, creemos suponen un paso importante para comprender las correlaciones existentes entre Glicoproteínas y Diabetes, al mismo tiempo que nos abren unas perspectivas para ulteriores trabajos de investigación.

X

BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A

=====

- (1) GOTTSCHALLK A.: Glycoproteina, their composition, structure and function. Elsevier éd. Amsterdam, 1966.
- (2) SPIRO R.: Glycoproteina: their biochemistry, biology and rôle in human disease. New. Eng. J. Med. vol 281, nº 19, 1.969.
- (3) LABAT J. Explorations des glycoproteines seriques. Problemes actuels de Biochimie Appliquée. Masson ed. 1.970.
- (4) HAMMARSTEN O.Z.: Physiol. Chem. 15, 202, 1.891.
- (5) LEVENE P.A.: Mucoproteina, Logmans, Green and col. London 1.925.
- (6) MEYER K.: Spriharber Sympsoio on quantitative biology 6,98 - 1938.
- (7) MEYER K.: Adv. Protein. Chem. 2, 249, 1945.
- (8) STACEY M.: Adv: Carbohydrate. Chem. 2, 161, 1946.
- (9) BLIX G.: Glycoproteide. Physiol. Chem. vol.1. pag.751. 1951:

- (10) MASAMUNE H.: Nippon Seikagatu Kaisi. J. Japan Bioch. Soc. - 18, 247, 1944.
- (11) MASAMUNE H.: Intern. Congr. Bioche. 3 rd. Bruxelles, 72, 1955.
- (12) KENT P.W. y Whithouse M.W.: Biochem. of the Aminosugars Butterworths. London 1955.
- (13) BETTELHEIM - JEVONS. F.R: Adv. Protein Chem. 13, 35, 1958.
- (14) JEANLOZ R.W.: Arthritis Rheumat. 3, 33, 1960.
- (15) ROBERT L. ROBFRT B.: La biosynthèse des glycoproteines du tissu conjonctif et sa régulation. Exposés annuels de biochimie médicale. Masson ed. 1971.
- (16) SIMKIM J.L.: Biosynthesis of plasma glycoproteins. Exposés annuels de biochimie medicale. Masson ed. 1971.
- (17) SARCIONE E.J.: The initial subcellular sites of incorporation of hexoses into liver protein. J. of Biol. Chem. vol. 239, nº 6. 1964.
- (18) MOLNAR J. ROBINSON; G.B. WINZLER R.J.: Biosynthesis of glycoproteins. IV. The subcellular sites of incorporation of glucosamine - 1 - C 14 into glycoprotein in rat liver. J. of Biol. Chem. vol. 240, nº 5, 1965.

- (19) HALLIMAN T. MURTY C.N. GRANT J.H.: Early labeling with glucosamine - C14 - of granular endoplasmic reticulum and free ribosomes from rat liver. Arch. of Bioch. and Phys. 125,715- -- 720. 1968.
- (20) LOUISOT P. LEBRE D. PRADA M - B GREBLE J.GOT R.: Biosynthèse - des glycoprotéines. Rôle des sites Cytoplasmiques dans les cellules embryonnaires et néoplasiques en culture en suspension. Can J. Biochem. 48, 1082, 1086. 1970.
- (21) GUIDOLLET J. LOUISOT P.: Clin.Chim.Acta 23,121,1321, 1969.
- (22) SPIRO M.J., SPIRO R.G.: Glycoproteins Biosynthésés: studies in thyroglobulin. Thyroid sialyl - transferase. J. of Biol.Chem.- vol. 243, n° 24, 1968.
- (23) LAWFORD G.R. SCHACHTER H.: Biosynthesis of glycoproteins by -- liver. The incorporation in vivo C 14 - glucosamine into protein - bound hexosamine and sialic acid of rat liver subcellular fractions. The J. of Biol. Chem. vol. 241, n° 22, 1966.
- (24) GRENSPAN F.: Clinical significance of serum mucoproteins. Adv. in Internal Medicine. vol. VII, 1955.
- (25) HEREMANS J.: Clin.Chim.Acta, 4,430, 1959.
- (26) SCHULTZE H, HEREMANS, J.: Molecular biology of humans proteins. Elsevier ed. 1968.

- (27) MONTREUIL J.: Les glycoprotéides. Procédés de détermination de la composition et de la structure de la fraction glucidique. Problèmes actuels de biochimie générale. Masson ed. 1972.
- (28) CHANDLER A.M., NEUHAUS O.W.: Synthesis of serum glycoproteins response to injury. Am. J. Physiol. 206, (I), 169, 172, 1964.
- (29) PACHON DIAZ J.: Alteraciones metabólicas en las esclerosis vasculares. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de Sevilla. 1.973.
- (30) RODRIGUEZ - PIÑERO Y BRAVO-FERRER F.J.: Algunos aspectos séricos de las broncopatías crónicas obstructivas. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de Sevilla. 1.973.
- (31) GOTTSCHALK A.: Perspectives Bol. Med. 5, 327, 1962.
- (32) WINZLER R.J. Devor A.W. Mehl J.W. Smyth I.M. - J. Clin. Invest. 27, 609, 1948.
- (33) SANCHEZ GUIJO P. ORTIZ LEYBA C. NUÑEZ CASTAIN C. RODRIGUEZ PIÑERO J. VILLAR ORTIZ J. PACHON DIAZ J. MEDINA REDONDO F. - Problemática actual de las glicoproteínas: Introducción a su repercusión clínica. Rev. Fac. Med. Sev. en prensa.
- (34) BIERRY H. - Compt. Rend. Soc. Biol. 116, 702, 1934.
- (35) GOTTSCHALK A. - Nature 172, 808, 1953
- (36) INAZAWA H. - TOHOKU J. EXPTL Med. 54, 53, 1951.
- (37) MASAMUNE H. YOSIZAWA A. - Tohoku J. Exptl. Med. 53, 155, 1950.

- (38) WALDROM D.M.- Nature 170,461, 1952.
- (39) WERNER I. y ODIN L.- Experientia 5, 233, 1949.
- (40) RIMINGTON C.- BIOCHEM J. 23, 430, 1929.
- (41) Id. " " 25, 1052, 1931.
- (42) WERNER I.- Acta Chem. Scand. 5, 1396,1951.
- (43) GRAS JI.- Proteinas plasmáticas. Jims ed. Barcelona 1967.
- (44) BYWATER H.W.- Uber Seromucoid. Biochem. Ztschr. 15,322, 1909.
- (45) GOTTSCHALK A.- Nature 10, 662, 1952.
- (46) OZAKI G.-J.Biochem.Japan 24,73,1935.
- (47) ODIN L. y WERNER I.- Acta Soc.Med.Upsaliensis: 57, 227, 1.952:
- (48) WERNER I y ODIN L.- Acta Soc.Med.Upsaliensis: 57, 230,1952.
- (49) WERNER I.- Acta Soc.Med.Upsaliensis: 58,1,1953.
- (50) WALDROM D.M.-Nature 170,461,1952.
- (51) DISCHE Z. y OSNOS M.-Federation Prcc. 11,202,1952.
- (52) WINZLER R.J.-Methods of Biochem.Anal. 2,279,1955.
- (53) KERBY G.P.- Effect of the inflamati6n on the Hexuronate Containing Polysaccharides of Human plasma.J.Clin.Inv. 37,962,1958.
- (54) WINZLER R.J.- Glycoproteins- "The plasma proteins" F.W. Putnan ed. V.I. Acad.Press Nueva York 1950.

- (55) SATAKE M. OKUYAMA T. ISHIARA K. y Schmid K.-Biochem J.95,749
1965.
- (56) MESTER L. MOCZAR E. y SZABADOS L.- C.R. Acad.Sci.Paris 265,877
1967.
- (57) GOTTSCHALK A. y Graham E.R.B.-The Proteins,2 ed;Neurath ed.Acad.
Press.Nueva York 1966,vol 4,P 95.
- (58) YAMASHIMA I. Makino M. Ban- I K y Kojima T.-J.Biochem. (Tokio)
58, 168, 1965.
- (59) MONGTGOMERY R. y Wu Y-C-J.Biol.Chem 238,3547,1963.
- (60) MONSIGNY M. Adam-Cosson A y Montreuil J.- Bull.Soc.Chim.Biol.
50,857,1968.
- (61) DAWSON G. y CLAMP J.R.-Biochem J. 107,341,1968.
- (62) SMYTH D.S. y UTSUMIS- Nature 216,332,1967.
- (63) BHARGAVA A.S y GOTTSCHALK A.-Biochim.Biophys.Acta. 148,132,1967.
- (64) BERTOLINI M. y PIGMAN W.-J.Biol.Chem.242,3776,1967.
- (65) HARBON S.,HERMAN G. y CLAUSER H.- Europ. J.Biochem. 4,265,1968.
- (65) LINDAHL U. y RODEN L.-J.Biol. Chem. 241,2113,1966.
- (67) Id .- Biochem.Biophys.Acta. 130,361,1966.
- (68) FRANSSON L.A.- Biochim.Biophys. Acta. 156,311,1968.
- (69) SPIRO R.G.-J.Biol.Chem. 242,1923,1967.

- (70) BUTLER W.T. y CUNNINGHAM L.W.-J.Biol.Chem. 241,3882,1966.
- (71) CUNNINGHAM L.W. y Ford J.D.-J.Biol.Chem. 243,2390,1968.
- (72) SPIRO R.G.- Studies on the monosaccharide sequence of the serum Glycoprotein fetuin J.Biol.Chem. 237,646. 1962.
- (73) Id,- Periodate oxidation of the Glycoprotein fetuin J.Biol. - Chem. 239,567,1964.
- (74) DUNN J.T. y SPIRO R.G..-The α_2 macroglobulin of Human Plasma. II Studies on the carbohydrate units. J.Biol.Chem.242,5556,1967.
- (75) SPIRO R.G.-The carbohydrate units of Thyroglobulin. J.Biol.Chem 239,567,1964.
- (76) BAHL O.P.- Human chorionic gonadotrophin: II Nature of the carbohydrate units. J. Biol.Chem. 244,575, 1969.
- (77) SPIRO R.G.-Studies on the renal glomerular Basement membrana: nature of the carbohydrate units and their attachment to the peptide portion. J. Bil.Chem.237,646. 1962.
- (78) ROBINSON G.B. Mplnar J. y Winzler R.J.-J.Biol.Chem.239,1134,1964.
- (79) SIMKIM J.L. y JAMIESON J.C.- Biochem. J. 103,153,1967.
- (80) MACBETH R.A.L.,BEKESI J.G.,SUGDEN E. y BICE S.J. Biol.Chem.240,- 3707, 1965.

- (81) GRANT P.T. y SIMKIM J.L.- Rep.Prog. Chem. 61,491,1966.
- (81) ORTIZ LEYBA C.: Estudio del espectro de las glicoproteinas del
(Bis) suero en las hepatopatas difusas. Tesis doctoral.Facultad de -
Medicina de Sevilla 1.973.
- (82) ENGEL M.B. y CATCHPOLE H.R.- Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 75,221 --
1950.
- (83) LARSKY- citado por J. Labat (5).
- (84) MUSIL J.-Clin.Chim.Acta.6,508,1961.
- (85) PETERS T.- J. Biol. Chem.237,1186,1962.
- (86) KOHN P. Winzler R.J. y Hoffman R.C.-Metabolism of D-Glucosamine
and N-acetyl-D-Glucosamine in the intact.Rat. J. Biol.Chem.vol -
240,nº 2, 1965.
- (87) ROBINSON G.B. MOLNAR J. y WINZLER R.J.-Biosynthesis of Glyco-
proteina: J. Biol.Chem.vol 239,nº 4, 1.964.
- (88) NEUTRA M. y LEBLOND C.P.- Radioscintographic comparison of the --
uptake of galactose-H₃ and glucose-H₃ in the Golgi region of - -
varocis caññs secretomg glycoproteins or Mucopolysaccharides. J.
Cell,Biol 30,137,1969.
- (89) NEUTRA M.LEBLOND C.D.- The Golgi apparatus. Sci.Amer. 220,100
1969.

- (90) O'BRIEN P.O., Canady M.R. Hall C.W. y Neufeld E.F.-Biochim. Biophys. Acta. 117,331,1966.
- (91) ROSEMAN S., CARLSON D.M. Jourdian G.W., McGuire E.J., Kaufman B. Basu S. y Bartolomew B.- Methodes in Enzymology. Neufel y Ginsburg ed. Acad. Press, Nueva York vol 8,354,1966.
- (92) O'BRIEN P.J. y MUELLEMBERG G.C.- Biochim. Biophys. Acta. 158,189 - 1968.
- (93) D'AMICO R.P. y KERN M.- J. Biol. Chem. 1.967, 242,3242.
- (94) EYLAR E.H. y COOK G.M.W.- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 1965,54,1678.
- (95) SARCIONE E.J. y CARMODY P.J.- Biochem. Biophys. Res. Comun 1966- - 22,689.
- (96) BOSMAN H.B. y EYLAR E.H.- Biochem. Biophys. Res. Commun. 30,89,1968.
- (97) JOHNSTON I.R. McGuire E.J. Jourdian G.W. y Roseman S.J. Biol. - - Chem. 241,5735,1966.
- (98) MCGUIRE E.J. y ROSEMAN S.J. Biol. Chem. 242,3745,1967.
- (99) TELSER A., ROBINSON H.C. y DORFMAN A.- Arch. Biochem. Biophys. 116 - 458, 1966.
- (100) SPIRO R.G. y SPIRO M.J.- Enzymatic synthesis of the hidroxylysine linke disaccharide of basement embranes and collagens. Fed. Proc.- 27,345, 1968.

- (101) BRITTER R.J. y DAVIDSON E.H.-Science 165,349,1969.
- (102) JACOB F. y Monod J.- in Biological Organisation.Harris G.S. ed Acad.Press. Londres P.1 1963. J. Mol Biol.3,318,1961.
- (103) BOTTIGER L.E. y CARLSON L.A.- Serun glycoprotein concentration - in normal men.Clin.Chim.Acta.5,664,1960.
- (104) BOTTIGER L.E. y STERKY G.- Serum proteins and Glycoproteins in - Normal Scholchildren.Acta.Med.Scan.vol 172,fac.3,1962.
- (105) SERUM Protein and Glycoprotein concentration in Newborns and in- fants.Scand J.Clin.Lab.Inv.14,sup,64:39 1.962.
- (106) KRUH J.-Biochem.Biophys.Acta.145,814,1967.
- (107) RAMBOURG A. HERNANDEZ W. y LEBOND C.P.-J.Cell.Biol.40,395,1969.
- (108) HAGOPIAN A.BOSMAN H.B. y EYLAR E.H.-Arch.Biochem.Biophys.128 - - 387,1968.
- (109) DATTA A. y GHOSH S.- Indian J.Biochem.4,197,1967.
- (110) ROBERT L.-J. DERMOCHEMIE Nº 83, 1.966.
- (111) SELLINGER O.Z. BEAUFAY H.JACQUES P. y col.-Tissue fractinación - studies.15.Intracellular distribución and properties of B-galac- tosidase in rat liver. Biochem J. 74,450,1960.
- (112) WEISSMAN B. HINRICHSEN D.F.-Mammalian-Acetylgalactosaminidase --

- occurrence, partial purification and action of linkages in submaxillary mucins. *Biochem.* 8,2034, 1.969.
- (113) MAHADEVAN S., NDUGUBA J.C., Tappel A.L. Sialidase of rat liver and kidney. *J. Biol. Chem.* 242,4409, 1967.
- (114) ARONSON N. Jr. de Duve C. - Digestive activity of Lysosomes. II the digestion on macromolecular carbohydrates by extracts of rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* 243: 4564, 1968.
- (115) MAHADEVAN S., TAPPEL A.L. - β -Aspartylglucosylamine amidohydrolase of rat liver and kidney. *J. Biol. Chem.* 242,4568, 1967.
- (116) Id. - Subcellular distribution of O -seryl- N -acetylgalactosaminidase in rat liver and kidney *Arch. Biochem.* 128,129 -- 1968.
- (117) MAHADEVAN S. DILLARD C.J. y TAPPEL A.L. - Degradation of polysaccharides, mucopolysaccharides and Glycoproteins by lysosomal glycosidases. *Arch. Biochem.* 129,525, 1.969.
- (118) HOLLMANN S.: Metabolism of glucuronic acid and ascorbic acid. In *Non-glycolytic Pathways of Metabolism of Glucose*. New York: Academic Press. 1.964.
- (119) TOUSTER O: Carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 31,407. 1.962.
- (120) BURNS J.J.: Ascorbic acid. In *Metabolism Pathways. Vol. I.* New York: Academic Press. 1.960.

- (121) HIATT H.H. Peutosuria. Metabolopatias hereditarias. Stanbury --
J.B. Wyugaarden J.B. y Fredrickson D.S. Salvat ed. Barcelona ---
1.963.
- (122) STROMIINGER J.L.: Nucleotide intermediates in biosynthesis of --
heteropolymeric polysaccharides. In connective tissue: Interce--
llular macromolecules. Boston: Little. Brown. 1.964.
- (123) DORFMAN A.: Metabolism of acid mucopolysaccharides. In connec--
tive tissue: Intercellular macromolecules. Boston: Little. Brown --
1.964.
- (124) WAITE A., HANDLER, Ph. y SMITH, E.: Principios de Bioquímica, 4ª --
ed. del Castillo (ed). Madrid 1.970.
- (125) LEHNINGER, A.L.: Bioquímica las bases estructurales de la estruc--
tura y función celular. Omega ed. Barcelona 1972.
- (126) GREENBERG, D.M.: Metabolic Pathways. Vol I. Academic. Press. Inc. --
New York 1967.
- (127) ROSEMAN, S.: Metabolism of connective tissue. Ann. Rev. Biochem --
28, 545. 1959.
- (128) LELOIR L.F.: Nucleotides and Saccharides. Synthesis in Polysacche--
rides in Biology. G.F. Springer (Ed) New York. 1958.
- (129) CABIB E. LELOIR L.F. y CARDINI CE.: Uridine diphosphate acetyl --
glucosamine. J. Biol. Chem. 203. 1055. 1953.

- (130) JOURDIAN G.W., SHIMIZU F y ROSEMAN, S.: Isolation of nucleotide -- oligosaccharides containing sialic acid. Fed. Proc, 20, 161, 1961.
- (131) ROBERT L: Les glycoproteines tissulaires: hypotheses concernant les membranes basales au cours du diabete. Press Medical, 79, 50 -- 1971.
- (132) SPIRO R.G.: Role of insulin in two pathways of glucosa metabo--- lism: in vivo glucosamine and glycogen synthesis. Ann. New York -- Acad. Sci. 82, 366, 1959.
- (133) STRAUMFJORD J.V. y WEST E.S.: In vivo synthesis of ascorbic acid by alloxan diabetic rat. Pro. Soc. Exper. Biol. Med. 94, 566, 1957.
- (134) WINEGRAD, A.I. and SHAW, W.N.: Glucuronic acid pathway activity -- in adipose tissue. Ame. J. Physiol. 206, 165, 1964.
- (135) WINEGRAD, A.I. and BURDEN, C.L.: L-Xylulose Metabolism in diabe--- tes mellitus. New England. Med. 274, 6, 1966.
- (136) PHELPS, Ch.F., HARDINGHAM, T.E. and WINTERBURY, P.Y. Studies on the con--- trol of nucleotic sugar metabolism in glycosaminoglycan biosyn--- thesis. Exposés annuels de Biochem. Med. Masson ed. Paris 1970.
- (137) SPIRO R.G.: Glycoproteins y Diabetes. Diabetes, 12, 223, 1963.
- (138) VILLAR ORTIZ J.: Tesis Doctoral 1973. Facultad de Medicina. Sevilla.
- (139) TEPPERMAN J.: Fisiologia Metabólica y Endocrina 2ª ed. Intera--- mericana ed. Mexico 1970.

- (140) LEVINE R. y GOLDSTEIN M.S.: On the mechanism of action of insulin. *Rec. Progr. Hormone Res.*, 11, 343, 1955.
- (141) KIPNIS, D.M. y NOALL M.W.: Stimulation of amino acid transport by insulin in the isolated rat diaphragm. *Biochem. Biophys. Acta*, 28 -- 266 1958.
- (142) TEPPERMAN J. y TEPPERMAN, H.M.: Some effects of hormones on cells and cell constituents. *Pharmacol. Re.* 12, 301. 1960.
- (143) CLAVSER, H. VOLFIN, P. y EBPE-BONIS D.: Effects of insulin on the phosphorus-32 mononucleotide and phosphocreatine labelling in the isolated diaphragm of the normal, the hypophysectomized, and the hypophysectomized growth-hormone-treated rat. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2, 369. 1962.
- (144) KRAHL M.E.: Speculations on the action of insulin, with a note on the hypoglycemic agents. *Perspectives Biol. Med.* 1, 69, 1957.
- (145) WOOL I.G. y Cols.: Effects of Insulin and Diabetes on Protein Synthesis by Ribosomes from Heart Muscle. *Am. J. Med.* 40, 716, 1966.
- (146) COHEN M.P.: Renal glomerular basement membrane synthesis in experimental diabetes. VIII^e Congress International Federation Diabetes. Brussels. *Excerpta Med.* 382. 1973.
- (147) ROBERT G. SPIRO.: *New Engl. J. of Med.*: Glycoproteins. *Biochem. Biology and Role in Disease*, vol 281, No 19, 1045. 1969.

- (148) CRAHAM ERB, GOTTEHALK A.: Studies on mucoproteins I. The structure of the prosthetic group of ovine submaxillary gland mucoprotein. *Biochim Biophys. Acta* 38: 513-524. 1960.
- (149) CARLSW D M.: Structure and immunochemical properties of digosaccharides isolated from pig submaxillary mucins *J. Biol. Chem.* -- 243: 616-626. 1969. ,
- (150) BIGNARDI C, AVRELI G, BALDUINI C, et al: Sulfosialopolysaccharide-peptide from dog submaxillary gland. *Biochem. Biophys. Res Commun* 17:310-312. 1964.
- (151) SPIRO R.G.: Glycoproteins: structure metabolism and biology. *New Engl. J. Med.* 269:566-573 and 616-621. 1963.
- (152) SPIRO R.G.: Studie on fetuin, a glycoprotein of fetal serum. --- II. Nature of the carbohydrate units. *J. Biol. Chem.* 237: 382--388 1962.
- (153) The Amino Sugars: The Chemistry and biology of compounds containing amino sugars. Edited by E.A. Balazs R W Jeanloz. Vol 2 A. New York. Academic Press 1965.
- (154) GOTTSCHALK A: Correlation between composition Structure shape and fraction of a salivary mucoprotein. *Nature (London)* 186 -- 949-951. 1960.
- (155) KENTPW. Allen A.: The biosynthesis of intestinal mucins. The effect

of salicylate on glycoproteins biosynthesis by sheep colonic and human gastric mucosal tissue in vitro. *Biochem J.* 106 : - 645-658. 1968.

- (156) HEREMAWS J.F. SCHULTZE H.E.: *Molecular Biology of Human proteins* Vol I, Elsevier ed., 762-770 1966.
- (157) SCHNEYER L.H. J.: *Dental Res* 34, 257. 1955.
- (158) BETTELHEIM F.A. AND S.K. DEY. *Arch. Biochem. Biophys.*, 109, 259, - - - 1955.
- (159) BLIX G. *Acta Physiol. Scand.*, I. 29, 1940.
- (160) CURTAIN C.C. And J. Pye, *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, 33, 315 1955.
- (161) GOTTSCHALK A. *Biochim. Biophys. Acta.* 24, 649, 1957.
- (162) HAMMARSTEN O. *2 Physiol. Chem* 12, 163. 1888.
- (163) HASHIMOTO Y.S. HASHIMOTO And W. PIGMAN, *Arch. Biochem. Biophys* - - - 104, 282, 1964.
- (164) Mc.CREA J.F. *Biochem J.* 55, 132. 1953.
- (165) MURPHY W. H. And. A. GOTTSCHALK, *Biochim Biophys. Acta.* 52, 349, 1961.
- (166) NISIZAWA K And W. PIGMAN. *Biochem J.* 75, 293, 1959.
- (167) QUINTARELLI G.S. TSUIKI y HASHIMOTO. And W. PIGMAN. *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, 2, 423. 1960.

- (168) QUINTARELLI E.S. TSUIKI J. HASHIMOTO AND W. PIGMAN. J. Histochem. Cytochem 9, 1961
- (169) SCHACKLEFORD J.M. AND C.E. KLAPPER AND J. AMAT, III 25, 1962.
- (170) SPICER S.S. AND L. WARREN J. Histochem Cytochem 8, 135, 1960.
- (171) HOROWITZ M.I. L. MARTINEZ AND V.L. MURTY. Biochim, Biophys, Acta 83, 305, 1964.
- (172) KENT S.P. J. Histochem. Cytochem 9, 491, 1961.
- (173) KENT S.P. J. Histochem. Cytochem II, 273, 1963.
- (174) KENT S.P. J. Ann. N.Y. Acad. Sci. 106, 389, 1963.
- (175) KERR A.C. The Physiological Regulation of Salivary Secretion in Man, Pergamon, Oxford, 1961.
- (176) TANDLER B. Am. J. Anat. III, 287, 1962.
- (177) TSUIKI S. AND W. PIGMAN Anth. Oral Biol. 2, I, 1960.
- (178) LANDSTEINER K. AND R.A. HART J. Biol. Chem. 140, 673, 1941.
- (179) MORGAN W.T.J. In E.W. WOLSTENHOLME AND M.O'CONNOR (eds) Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides, Churchill, London - - - 1958 página 200.
- (180) SCHIFF F, Über die Gruppenspezifische Substanz des Menschenkörpers. Fischer. Jena, 1931.

- (181) TASIRO K. Z. *Immunitätsforsch*, 93,110,1938.
- (182) HOROWITZ M.I. y HASHIMOTO AND PIGMAM. *Niochim, Biophys. Acta* 83 -- 209,1964.
- (183) LEACH S.A. *Nature* 199,486,1963.
- (184) BURGER - GIRARD N. *SCWEIZ. Med. Wochsche*, 94,23,1964.
- (185) ELLISON S.A. P.A. MASHIMO AND J.D. MANDEL J. *Dental Res.* 39,292 - 1960.
- (186) GABL F. in H. PEETERS (Ed) *Protides of the Biological-Fluids Proceedings of the fth colloquion, Bruges 1959. Elsevief, Amsterdam -- 1960, Página 61.*
- ((187) GABL F. AND H. WACHTER in H. PEETERS (ed) *Protides of the Biological Fluids, Proceedings of the 9th Colloquium, Bruges 1961. Elsevier - Amsterdam 1962 Página 336.*
- (188) HIRSCH-MARIE H. AND P. BURTIN *Rev. Franc, Etudes. Clin. Biol*, 8, 145-- 1963.
- (189) KRAUS F.W. AND S. SIRISINHA. *Anch. Oral Biol*, 7, 221, 1962.
- (190) MANDEL I.D. AND S.A. ELLISON *Arch. Oral Biol* 3, 77, 1961.
- (191) MASSD P.L, A.O. CARBONARA AND J.F. HEREMAKS, *Biochim. Biophys. Acta* 107, 1965.
- (192) STOFFER H.R. F.W. KRAUS AND A.C. HOLMES, *Proc. Sot. Exptl. Biol.* -

- Med. III, 467, 1962.
- (193) TOMASI T.B. AND S. ZIGELBAUM I. Clin. Invest. 42, 1552, 1963.
- (194) GABL F. AND H. WACHTER in H. PEETERS (Ed), Protides of the Biological Fluides, Proceedings of the 9 th Colloquium, Bruges 1961 Elsevier Amsterdam 1962 página 336.
- (195) STOFFER H.R. F.W. KRAUS AND A.C. HOLMES Proc. Soc. Exptl. Biol --- Med. III, 467 1962.
- (196) GABL F. in H. PEETER (ed) Protides of the Biological Fluids, --- Proceedings of the 10 th Colloquium, Bruges 1962, Elsevier, Amsterdam Página 230, 1963.
- (197) MASSON P.L. J.F. HEREMANS AND J. PRIGNOT, Unpublished.
- (198) SIMONS K, T. Weber, M. Stiel AND R. GRASBECK, Act. Med. Scaude. --- Suppl 412, 257, 1964.
- (199) SIMONS K, societatis Scientiarum Fennicce Commentationes Biologicae (Helsinki) 27,7, 1964.
- (200) COUSINS P.J. J. CLIN. Pathol. 14, 204, 1961.
- (201) LASHLEY K.S. Psychiat 23, 446, 1916.
- (202) CURBY W.A. J. Lab. Clin Med. 41, 493, 1953.
- (203) Louria R.S. Am. J. Diseases Chilchen 65, 455, 1943.
- (204) SCHNEYER L.H. J. Dental Res. 34, 257, 1955.

- (205) KOSTLIN A. AND RAUCH, *Helv. Med. Acta*, 24,500,1957.
- (206) KERR A.C., *the Physiological.Regulation of Salivary Secre---*
tion in Man,Pergamon Oxford 1961.
- (207) BADIN ET JACKSON. *Ann.Biol.Clin.* 12,80 1954.
- (208) SHETJAR M.R. et col.:Determination of serum polysacarides by --
the triptofano reaction. *Proc. Soc.Exp,Biol.Med.* 57, 125, 1948
- (209) ELSON L.A. and MORGAN W.T.J.: A colorimetric method for the ---
determination of N. acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine.
*J. Bioch.*988 1934.
- (210) CABEZAS J.A. and VAZQUEZ PORTO J.: *Clinical Chem.* 10,11 1964.
- (211) DISCHER Z. and SHETTER,L.B: *J. Biol Chem* 175-595 1948.