

ESTUDIO DE ALGUNOS ASPECTOS ELECTRO-QUIMICOS DE LA PERMEABILIDAD RUMINAL

Lic. Carlos García Moreira ¹

Bach. Miguel Cabezudo ²

Bach. Roberto M. Tagle ³

Bach. Fernando Mendoza ⁴

El movimiento de diversos solutos a través del epitelio ruminal es un hecho ampliamente conocido y de fundamental importancia para la homeostasis de los rumiantes y por tanto también para la comprensión de diversas situaciones patológicas que se producen en estos animales.

Pero no obstante el gran número de investigaciones efectuadas persiste la incertidumbre acerca de cómo caracterizar adecuadamente la fisiología de este epitelio. Ello se debe a la complejidad del medio biológico que constituye el contenido ruminal, a la actividad mecánica, a la variabilidad del flujo sanguíneo y aún a la actividad metabólica del propio epitelio.

Siguiendo una línea que ha dado buenos resultados en otros campos de la Fisiología nosotros pensamos que la comprensión global de tan complicadas situaciones únicamente es abordable mediante el diseño de modelos físico-químicos sencillos y aptos para el análisis de comportamiento mediante técnicas de computación. Posterior-

mente se irán introduciendo progresivamente sofisticaciones que den cuenta de los datos experimentales y se irá perfeccionando el modelo en la medida en que este resulte apto para prever y simular situaciones normales o patológicas.

En el presente trabajo damos cuenta de nuestra experiencia en el abordaje del problema mediante la metodología introducida por Ussing y Zerah (1) y adaptada al rumen por Ferreira, Harrison y Keynes (2) a la cual le hemos introducido una serie de modificaciones. Asimismo adelantamos algunos aspectos del modelo a proponer en conexión con los resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

En todos los casos trabajamos con hojas de epitelio de la pared del saco dorsal del rumen despegadas de la capa muscular mediante disección atraumática bajo inmersión en solución fisiológica termostatzada y oxigenada.

El dispositivo de estudio se esquematiza en la Figura 1.

La hoja de epitelio (E) se monta entre dos cámaras (c y c') cerradas construídas

1) Prof. Tit. de la cátedra de Bio-Física.

2) Asistente de la cátedra de Bio-Física.

3) Ayudante de la cátedra de Bio-Física.

4) Ayudante de la cátedra de Bio-Física.

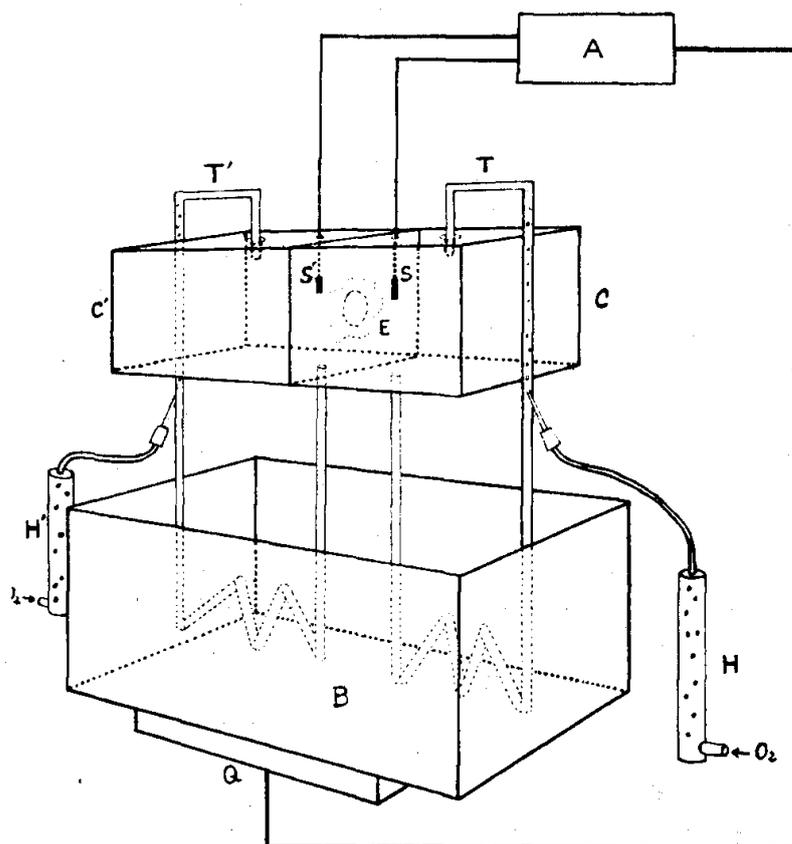


FIG. 1

Esquema del montaje de una hoja de epitelio. - E = epitelio. c y c' = cámaras. T y T' = circuito externo. B = baño calefactor. H = columna de agua. S y S' = termistores. Q = calefactor. A = circuito operacional.

en acrílico La superficie útil de epitelio es de 2 cm² y las cámaras laterales tienen una capacidad de 40 cm³.

Cada cámara está conectada a un circuito exterior (T y T') de polietileno de 10 cm³ de capacidad, por donde circula la solución fisiológica impulsada por la presión de un burbujeo de Oxígeno, que a la vez mantiene constante la presión parcial de este gas en la solución.

El Oxígeno se equilibra previamente con vapor de agua pasando a lo largo de una columna de agua destilada (H) antes de ingresar al circuito.

Una parte del circuito exterior se sumerge en un baño de agua termostatzada (B) a temperatura adecuada para compensar las pérdidas de calor de todo el sistema y mantener constante en 39°C la temperatura de la solución en inmediato contacto con el epitelio. Con tal fin se controla el circuito calefactor (Q) a través de un dispositivo analógico operacional (A) que recibe información desde dos termistores (S y S') en contacto con la solución próxima al epitelio.

El montaje que se agrega a lo descrito para efectuar medidas eléctricas se esquematiza en la Figura 2.

Para captar las diferencias de potencial eléctrico usamos electrodos impolarizables (e y e') contruídos con alambre de Plata recubierto electrolíticamente de Cloruro de Plata y montados en tubos de vidrio de punta fina llenos de KCl 3 M retenido sobre Agar al 4 %.

El potencial recogido por los electrodos es amplificado electrónicamente (A) y luego leído sobre un voltímetro (ΔV) con apreciación de 0.1 miliVoltio (mV).

Los electrodos no se ponen en contacto con la solución de las cámaras, sino que se sumergen en vasitos (v y v') llenos con KCl 3 M y que se conectan con dichas cámaras a través de puentes (p y p') de vidrio capilar llenos de Agar-KCl 3 M.

A lo largo de todo el experimento se controla sistemáticamente que la diferencia de potencial cuando los electrodos están en un mismo vasito sea inferior a 0.1 mV, de modo que los voltajes registrados correspondan a diferencias de potencial

eléctrico efectivamente existentes entre ambos lados del epitelio.

En el extremo de cada cámara se coloca un puente grueso (P y P') lleno de solución fisiológica retenida en Agar al 4 %, y estos puentes se conectan a su vez con los vasitos (V y V') llenos de solución fisiológica.

Utilizando dos electrodos impolarizables gruesos (E y E') de Ag-AgCl y Agar-KCl sumergidos en los vasitos es posible hacer circular corriente eléctrica desde una cámara a la otra, a través del epitelio.

Para aplicar la corriente utilizamos un generador variable (G) y medimos la intensidad de la misma con un micro-amperímetro (μA).

Llamaremos corriente saliente a la que circula desde el lado luminal al sanguíneo, y entrante a la de sentido inverso.

Con este dispositivo experimental podemos medir la diferencia de potencial entre ambos lados del epitelio y simultáneamente aplicar una corriente que lo modifique.

Se llama Potencial de Epitelio a la ΔV existente entre ambos lados en ausencia

de corriente aplicada exteriormente. Se indicará por: E.

Se llama Corriente de Corto Circuito a la que anula exactamente a la ΔV a través del epitelio. Se indicará por: C.C.C.

Esta intensidad de corriente mide la intensidad del transporte activo o metabólico de iones efectuado por el epitelio, pues no existiendo en tal situación diferencia de potencial ni de concentraciones el movimiento de cargas que constituye la corriente corresponde a iones que son movidos en base a un consumo de energía metabólica.

La solución fisiológica utilizada tiene la siguiente composición:

Na Cl	110 mM
K Cl	5 mM
Ca Cl ₂	2 mM
Mg Cl ₂	2 mM
Na H CO ₃	25 mM
Na ₂ H PO ₄	2 mM
Glucosa	5 mM
Acetato de Na	5 mM
Propionato de Na	5 mM
Butirato de Na	5 mM

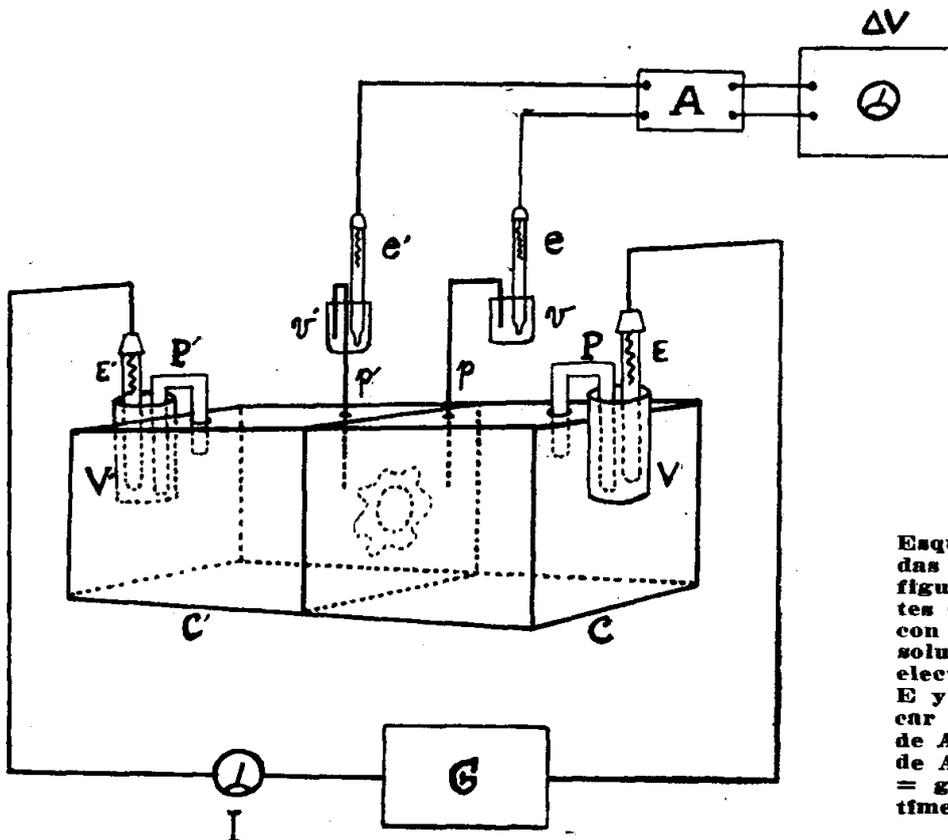
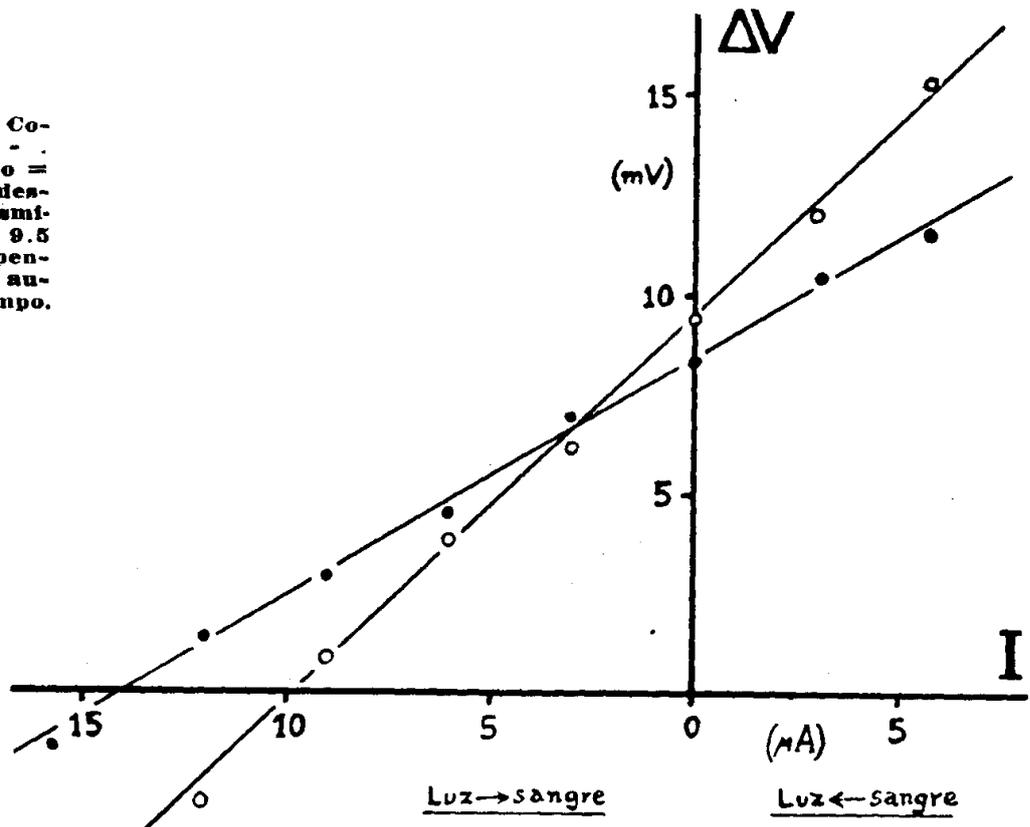


FIG. 2

Esquema del sistema de medidas eléctricas. Al montaje de la figura 1 se agregan los siguientes elementos: v y v' = vasitos con KCl. V y V' = vasitos con solución fisiológica. e y e' = electrodos para medir voltaje. E y E' = electrodos para aplicar corriente. p y p' = puentes de Agar-KCl. P y P' = puentes de Agar-KCl. G = generador variable. V = voltímetro. I = microamperímetro. A = amplificador.

FIG. 3

Relación Voltaje - Corriente del epitelio. - - = valores iniciales, o = valores una hora después. La C.C.C. disminuye desde 14 hasta 9.5 mA en 1 hora. La pendiente de la recta aumentó en ese tiempo.



En los lavados iniciales se agregan antibióticos a la solución para inhibir la actividad bacteriana:

Sulfato de

Estreptomicina 1 mg / lt

Penicilina G Sódica . . . 20.000 u.i. / lt

En ciertos experimentos el anión Cl^- es reemplazado por el anión SO_4^{--} .

En ciertos experimentos el catión Na^+ es reemplazado por el catión Li^+ .

En los experimentos en que se varió la concentración de ión K^+ el mismo fue total o parcialmente reemplazado por el ión Na^+ (la sustitución del 100 % del K^+ corresponde a un aumento del Na^+ de sólo el 3.6 %).

En los experimentos en que se aplicó un gradiente de presión hidrostática a través del epitelio el mismo fue generado aumentando el burbujeo en uno de los circuitos y medido por la diferencia de nivel líquido entre ambas cámaras.

Como inhibidor del transporte iónico activo se utilizó Ouabaína en dosis de $5 \cdot 10^{-5}$ M.

Para la obtención de las hojas epiteliales se siguieron 4 procedimientos:

- A) Extracción quirúrgica de ovejas anestesiadas y alimentadas hasta 12 horas antes de la operación.
- B) Extracción rápida de ovejas sacrificadas mediante sección carotídea.
- C) Extracción de vacas sacrificadas en frigorífico e inmediata experimentación en la propia planta frigorífica.
- D) Extracción de vacas sacrificadas en frigorífico y traslado hasta el laboratorio de Facultad en recipiente termostático y oxigenado.

RESULTADOS

I) RELACION VOLTAJE - INTENSIDAD DE CORRIENTE

En todos los preparados se realizó el estudio de esta relación funcional aplicando corrientes y midiendo el voltaje que ellas determinan en el epitelio.

Para $I = 0$ el voltaje corresponde al Potencial de Epitelio del preparado.

La Figura 3 ilustra un resultado típico

La pendiente de la recta corresponde a la Resistencia Eléctrica del Epitelio:

$$|R| = \frac{|\Delta V|}{|I|}$$

se expresa en Ohmios.

Para determinar la recta se aplicaron 8 valores determinados de corriente en orden al azar a fin de descartar cualquier efecto de una variación sistemática, a su vez cada serie de 8 determinaciones fue repetida 6 veces en rápida secuencia.

De modo que para cada valor de la variable independiente (I) tenemos 6 valores individuales de la variable dependiente (ΔV), aunque para simplificar en la gráfica únicamente se indican los promedios.

Para determinar la recta de mejor ajuste a los datos utilizamos el Método de Mínimos Cuadrados (9) según:

$$R = \frac{\frac{\sum (\Delta V_i \cdot I_i) \cdot \sum (\Delta V_i) \cdot \sum (I_i)}{\sum (\Delta V_i \cdot I_i)} - \frac{\sum (\Delta V_i) \cdot \sum (I_i)}{N}}{\frac{[\sum (I_i)]^2}{N} - \frac{(\sum I_i)^2}{N}}$$

La ordenada en el origen de las abscisas vimos que es E y se calcula a partir de los dos promedios generales: — ———

$$\Delta V = E - R \cdot I \quad E = \Delta V - R \cdot I$$

En el caso de la Figura 3 la R vale 600 Ohmios y $E = 8.4$ mV.

Como trabajamos con 2 cm² de epitelio, tenemos una Resistencia Específica de Epitelio de 1200 Ohmios/cm².

La C.C.C. en este caso es de 14 μA , o sea de 7 $\mu A / cm^2$.

En algunos experimentos se realizó Análisis de Varianza para docimar la bondad del ajuste, pero en general esto es innecesario en presencia de la linealidad de los datos.

Al cabo de una hora de realizada la determinación de la recta se procede a una nueva determinación, y en todos los casos se verifica que la C.C.C. ha disminuído, indicando deterioro del preparado con el tiempo. A su vez la Resistencia del Epitelio aumenta.

La rapidez de la disminución de la C.C.C. fue mucho mayor en los experimentos del tipo D y B.

La Tabla I resume los datos experimentales según el procedimiento empleado para obtener el epitelio:

T A B L A I

Proced.	Repetic.	E	S	C.V.	CCC	S	C.V.	Δ CCC	S	C.V.
A	4	9.8	2.2	23	5.2	1.3	25	2.2	0.4	18
B	6	6.1	2.5	41	4.3	1.8	42	3.2	1.2	38
C	15	11.6	2	17	8.1	1.6	20	2.1	0.4	19
D	30	5.0	1.9	38	3.7	1.5	40	3.0	1.2	35

E — Potencial de Epitelio Medio (mV)

CCC — Corriente de Corto Circuito Media ($\mu A / cm^2$)

Δ CCC — Variación Media de CCC en la 1ª hora ($\mu A / cm^2 \cdot h$)

S — Desvío standard

C.V. — Coeficiente de Variación Porcentuado

De la observación de la Tabla I resulta evidente la mejor performance obtenida por los procedimientos A y C.

II) RESPUESTA DEL POTENCIAL A CAMBIOS DE CONCENTRACION DEL POTASIO

Un potencial de difusión para el ión Potasio a nivel del lado luminal ha sido indicado por algunos autores (11), (12) además del mejor conocido a nivel del lado seroso.

Dado que el elemento conflictivo está en el comportamiento del lado cornificado del epitelio, realizamos experiencias tendientes a verificarlo.

En 10 experimentos de tipo C se aplicaron en orden al azar 6 concentraciones distintas de Potasio en el lado luminal, mien-

tras que el lado seroso se mantenía enfrenteado a la concentración normal de 5 mM.

A fin de discutir la existencia de un potencial de difusión para la ión K^+ debemos analizar si el Potencial de Epitelio se modifica como lo hace el Potencial de Equilibrio Electro-Químico para el ión K^+ (Σ_{K^+}) en presencia de las distintas concentraciones extracelulares:

$$\Sigma_{K^+} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \lg \frac{[K^+]_{ext}}{[K^+]_{int}}$$

Reagrupando constantes:

$$B = \frac{R \cdot T \cdot 2,3}{z \cdot F}$$

$$\Sigma_{K^+} = B \cdot \log \frac{[K^+]_{ext}}{[K^+]_{int}} = B \cdot \log [K^+]_{ext} - B \cdot \log [K^+]_{int}$$

Como la concentración celular $[K^+]_{int}$ puede suponerse constante podemos escribir:

$$A = B \cdot \log [K^+]_{int}$$

$$\Sigma_{K^+} = B \cdot \log [K^+]_{ext} - A$$

Esta última expresión corresponde a una relación lineal entre las concentraciones de Potasio expresadas logarítmicamente y los potenciales eléctricos.

La Figura 4 muestra un resultado típico en que para cada $[K^+]_{ext}$ se ha determinado 5 veces el Potencial de Epitelio, calculándose los respectivos promedios y su Intervalo de Confianza a nivel de confianza del 95 % de Probabilidad.

El ajuste de la recta se realiza mediante Mínimos Cuadrados y la bondad del ajuste mediante Análisis de Varianza.

En todos los experimentos el ajuste resultó admisible a nivel de confianza del 95 % de Probabilidad.

III) NATURALEZA DE LA CORRIENTE DE CORTO CIRCUITO

La Figura 5 muestra un experimento típico en que se efectuaron distintas acciones modificadoras de la CCC de acuerdo al conocimiento general sobre epitelios.

En las zonas I y IV de la gráfica el epitelio está en solución fisiológica normal, pero la CCC es menor en IV debido al deterioro temporal que hemos descrito antes.

En II y en V el epitelio está en presencia de solución en que el ión Cl^- está reemplazado por el ión SO_4^{--} , produciéndose un notable aumento de la CCC. Aquí nuevamente vemos que el deterioro temporal hace imposible retornar a los valores previos.

En la zona III se ha reemplazado al catión Sodio por el Litio, en medio de Sulfato. Se verifica desaparición casi completa

de la CCC, evidenciando la importancia del ión Na^+ transportado activamente gracias al metabolismo epitelial.

En la zona VI se ha aplicado al epitelio en medio de Sulfato y de Sodio una dosis de Ouabaína sobre el lado luminal, obteniéndose una discreta reducción de la CCC.

En la zona VII se aplica la misma dosis de Ouabaína, pero ahora sobre el lado seroso, y se obtiene anulación de la CCC.

IV) EFECTO DE LA PRESION HIDROSTATICA SOBRE LA C.C.C.

Poca atención ha recibido hasta ahora la interrelación entre los fenómenos mecánicos y de absorción a nivel del rumen.

Desde que a nivel de la piel de sapo se han evidenciado elementos de tal relación (7) y teniendo en cuenta la similitud anatómica de esta estructura con el rumen, realizamos algunos experimentos en que se estudia la CCC en presencia de gradientes

de presión hidrostática entre ambos lados del epitelio.

Tomando en consideración los datos sobre la presión intra-ruminal en el reposo entre contracciones (8) aplicamos diferencias de presión de hasta 10 cm H_2O desde el lado seroso al luminal.

La Figura 6 muestra los promedios de CCC y su intervalo de confianza para 6 repeticiones de una serie de 6 valores de presión hidrostática aplicados en orden al azar al mismo preparado.

Entre la aplicación de dos presiones distintas se retorna a la condición de gradiente nulo a efectos de verificar que en esa condición la CCC no ha variado en forma significativa.

Se halla que no existe variación sistemática de la intensidad de la CCC al incrementarse la presión transmural hasta montos muy superiores a los que han sido reportados como normalmente existentes a través de la pared ruminal en el reposo entre contracciones.

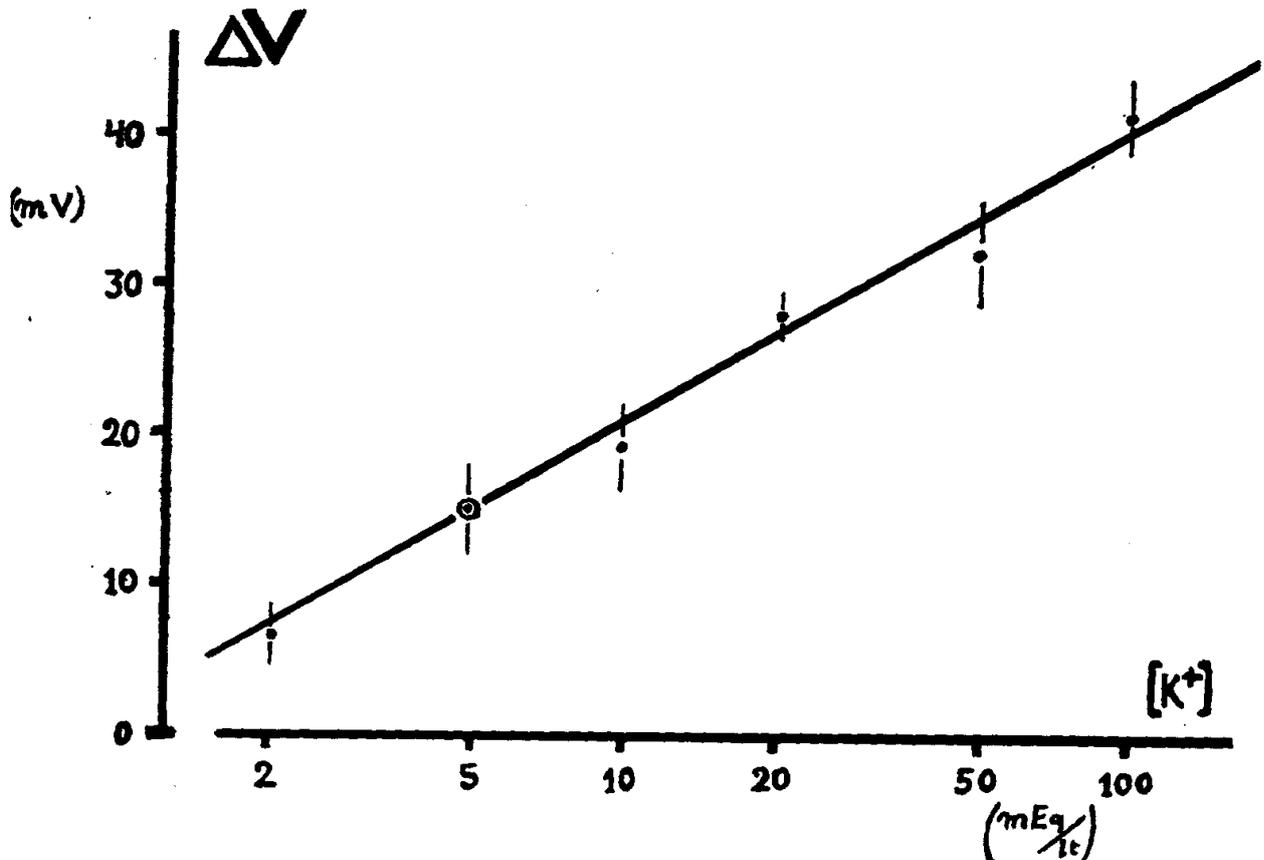


FIG. 4

Dependencia del Potencial de Epitelio respecto a la concentración del ión Potasio en el lado luminal. - El eje de abscisas está en escala logarítmica. Se indican los promedios y sus respectivos intervalos de confianza para $P = 95\%$.

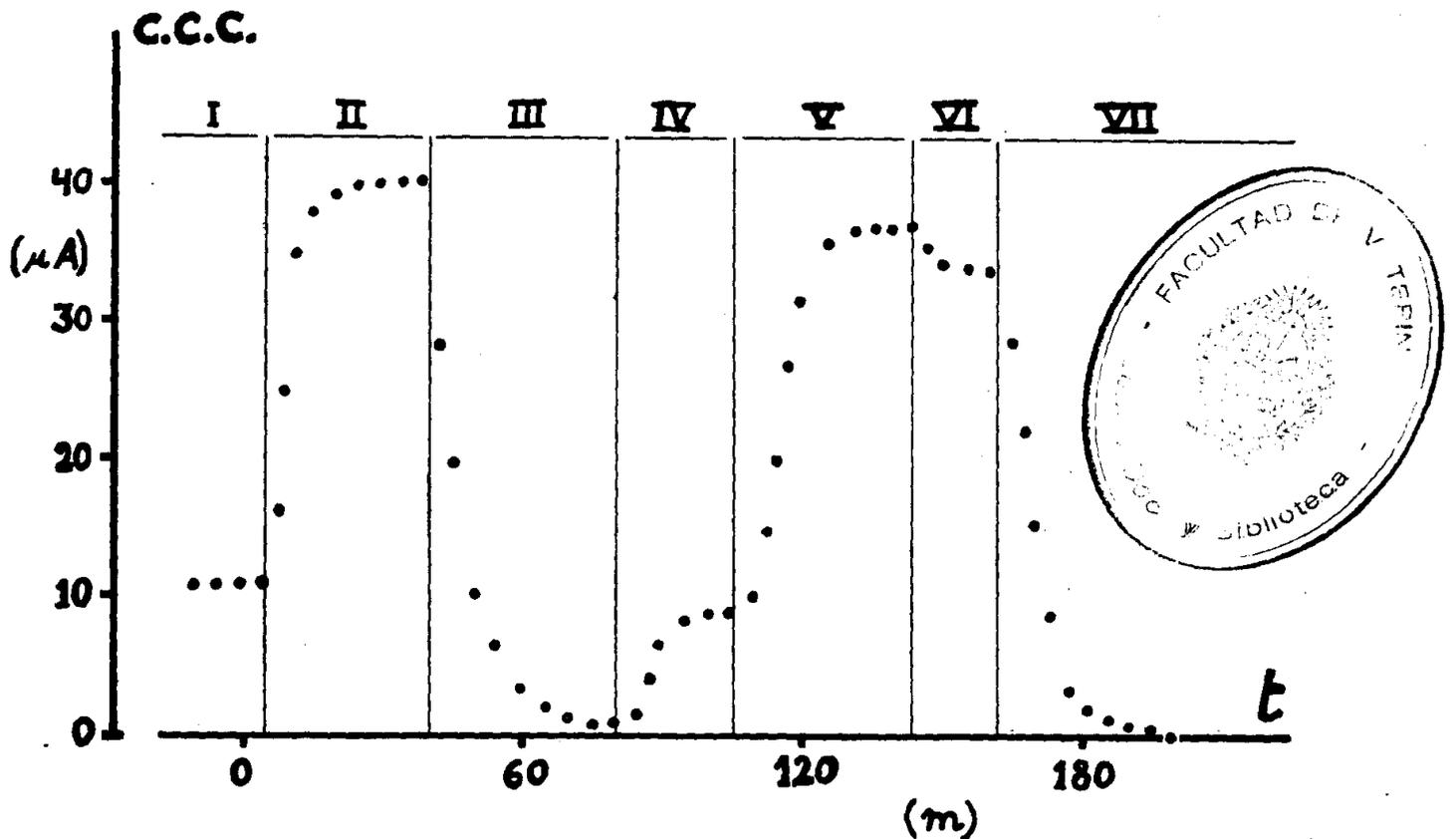


FIG. 5

Estudio de la C.C.C. en diferentes medios. - Zonas I y IV = Solución normal. Zonas II y V = $16n\text{ Cl}^-$ reemplazado por $16n\text{ SO}_4^{2-}$. Zona III = Medio de Sulfato sin Sodio. Zona VI = Medio de Sulfato y Sodio. Ouabaina en lado luminal. Zona VII = Medio de Sulfato y Sodio, Ouabaina en lado seroso.

DISCUSIÓN

Los presentes resultados demuestran en primer lugar la posibilidad de realizar en nuestro medio estudios básicos sobre fisiología ruminal.

De los cuatro procedimientos ensayados para obtener los preparados el D y el B deben ser descartados en razón del rápido deterioro y la gran variabilidad de los resultados (ver Tabla I).

El procedimiento A, si bien proporciona preparados relativamente estables que proporcionan datos con poca dispersión, resulta excesivamente oneroso para nuestro medio, aparte de exigir la coordinación con un equipo quirúrgico.

El procedimiento C, toma de muestras en frigoríficos y experimentación inmediata en la propia planta, aparece como de elección, desde que permite compensar el inconveniente de la corta sobrevivencia en base al ahorro de tiempo de traslado.

El deterioro relativamente rápido de la C.C.C. aún en las mejores condiciones

que fue posible obtener mediante el procedimiento C podría ser debido al ayuno de los animales previo a la faena. Esta forma de ver está de acuerdo con datos de otros autores sobre deterioro de distintas funciones ruminales in vitro (2) (5).

El comportamiento óhmico verificado en la relación Voltaje-Corriente coincide en líneas generales con lo observado por Ferreira, Harrison y Keynes (2).

Los resultados del numeral II confirman la existencia de una permeabilidad selectiva alta para el ión Potasio del lado escamoso (luminal) del epitelio, lo que determina que el mismo se comporte como un electrodo de Potasio.

Si tenemos en cuenta que el lado seroso también se comporta en forma similar es previsible, habida cuenta del movimiento activo de catión Na^+ en la dirección luz-sangre, la existencia de un transporte activo de ión K^+ en sentido opuesto aunque de menor intensidad. De modo que el modelo más sencillo debería incluir dos generados-

res (y sus resistencias internas) en paralelo y con polaridad opuesta: el de Na^+ con el polo positivo hacia el lado sanguíneo y el de K^+ con el polo positivo hacia el lado luminal.

En el modelo ambos generadores deben estar interrelacionados, pero resulta difícil adelantar una hipótesis sin disponer de información detallada sobre los flujos iónicos.

También a diferencia con lo que ocurre en la piel de sapo se ha verificado que cuando se sustituye al anión Cl^- por el anión SO_4^- la C.C.C. aumenta en forma muy nítida, esto estaría señalando la existencia de un transporte activo de anión Cloro. En efecto, en la condición de C.C.C. los iones que no son objeto de transporte metabólico no se mueven, y por tanto no contribuyen a la corriente, de modo que su eliminación no introduce modificación de la intensidad de la corriente.

Scott (3) ha reunido evidencias de transporte activo de Cl^- desde el rumen a la sangre de ovejas anestesiadas, y también los datos de von Engelhardt (10) apoyan esta interpretación.

De modo que el modelo debería incluir un tercer generador en paralelo, con el polo positivo hacia el lado luminal (igual que el del K^+), de fuerza electromotriz proporcional a la intensidad del transporte metabólico de anión Cl^- .

Nuevamente aquí se plantea la posibilidad de un acoplamiento con el principal transporte activo: de Sodio.

De modo que aún en primera aproximación el modelo no puede constar únicamente de tres generadores en paralelo, sino que cada uno de ellos debe estar parcialmente controlado por unidades operacionales que reciban información de los otros y la procesen según funciones de transferencia que representen las relaciones funcionales verificadas entre los distintos transportes.

Para tener una idea de la importancia homeostática de estos procesos podemos efectuar un sencillo cálculo: suponer que el 70 % de la C.C.C. correspondiente a Na^+ y Cl^- . Entonces los $7 \mu\text{A} / \text{cm}^2$ estarían representando un flujo neto de $0.26 \mu\text{M} / \text{cm}^2$. hora de NaCl desde el rumen a la sangre.

Si ahora tenemos en cuenta que la superficie ruminal de una oveja adulta puede ser del orden de 10.000 cm^2 , al cabo de las 24 horas se habrá transportado una fracción importante del NaCl total secretado por vía salival.

Finalmente, es un hecho muy interesante el que la C.C.C. mantenga su valor en presencia de presiones hidrostáticas hasta de $10 \text{ cm H}_2\text{O}$. En efecto, si en el epitelio ruminal tiene lugar el aumento del espacio extracelular visto por Voute y Ussing en la piel de sapo (7), el transporte activo de Sodio mantendría su intensidad pese a estar muy expandidos los espacios intercelulares. Entonces podrían tener lugar en los interespacios fenómenos de arrastre anómalo de otros solutos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— USSING, H.H. y ZERAH, K.: *Acta Physiol. Scand.* 23: 110-127; 1951.
- 2.— FERREIRA, H.G., HARRISON, F.A. y KEYNES, R.D.: *J. Physiology* 187: 631-644; 1966.
- 3.— SCOTT, D.: *Res. Vet. Sci.* 11: 291-293; 1970.
- 4.— DOBSON, A. y PHILLIPSON, A. T.: *J. Physiology* 140: 94-104; 1958.
- 5.— STEVENS, C.E.: *American J. Physiol.* 206: 1099-1105; 1964.
- 6.— HARRISON, F.A.: *Phyl. Trans. Royal Soc. London B* 262: 301-305; 1971.
- 7.— VOUTE, C.L. y USSING H.H.: *Exp. Cell Res.* 62: 375-383; 1970.
- 8.— BALCH, J., KELLY, A. y HEIM, H.: *Brit. J. Nutrition* 5: 110-125; 1951.
- 9.— CRAMER, H.: "Métodos matemáticos de estadística". Edit. Aguilar (Madrid); 1968.
- 10.— VON ENGELHARDT W.: *Proc. Symp. IAEA-FAO, Atenas 1972, IAEA-SM 156/29: 273-284.*
- 11.— SELLARS, A.F. y DOBSON A.: *Res. Vet. Sci.* 1: 95-102; 1960.
- 12.— SCOTT, D.: *Quartl. J. Exp. Physiol.* 51: 60-69; 1966.

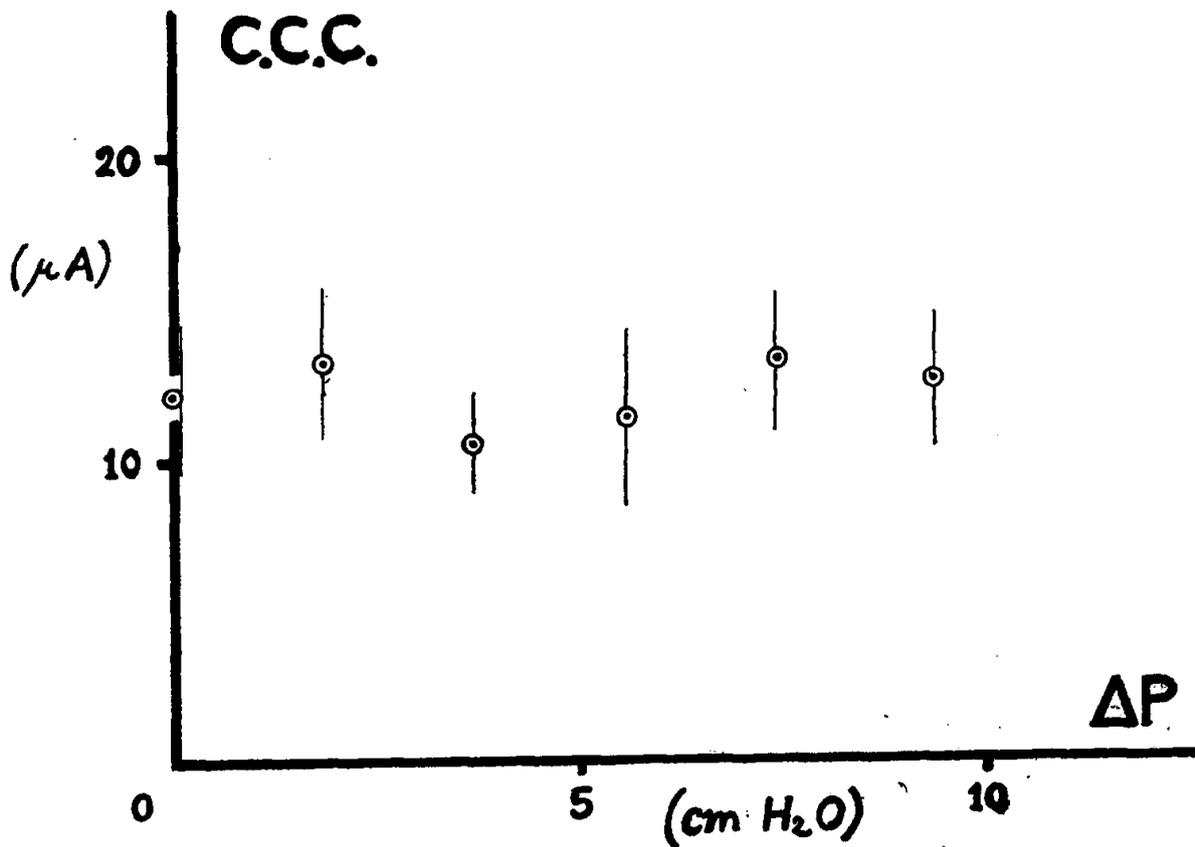


FIG. 6
 Estudio de la C.C.C. con gradientes de presión hidrostática. - Se indican los promedios y sus respectivos intervalos de confianza para $P = 95\%$.

RESUMEN

- 1) Se describe un montaje para estudios de permeabilidad del epitelio ruminal y se prueban varios procedimientos para obtener los preparados.
- 2) Se verifica comportamiento ohmico del epitelio y se calculan sus parámetros.
- 3) Se comprueba que el lado luminal del epitelio exhibe un potencial de difusión para el ión Potasio.
- 4) Se halla que la Corriente de Corto Circuito depende parcialmente del ión Cl^- .
- 5) No se modifica la Corriente de Corto Circuito por aplicación de una presión hidrostática hasta de 10 cm de H_2O desde el lado sanguíneo.
- 6) Se discuten los resultados experimentales y se inicia el diseño de un modelo.

SUMMARY

- 1^o) A modified technique to study ruminal permeability is described and four methods to obtain viable sheets of isolated epithelium are tested with it.
- 2^o) An ohmic behaviour of the epithelium is founded and parameter calculated.
- 3^o) A diffusion potential for Potassium is observed on the luminal side.
- 4^o) The short circuit current is shown partially dependent on the Chloride.
- 5^o) Hydrostatic gradients until 10 H_2O cm. from blood to lumen side does not change the short circuit current.
- 6^o) Experimental results are discussed and some elements for a model are advanced.