CONSTANTES BIO –FISICOQUÍMICAS DEL LIQUIDO SINOVIAL DE BOVINOS. IONOGRAMA Y PROTEÍNAS TOTALES.

Carrozza[(1)], J. S. W.; Noia[(2)], M. A.; Frígoli[(3)], A.E. ; Miguel[(2)], M.; González[(2)] , G.; Aconitani[(2)], M; Cura , S[2].

[1] Prof. Asociado a cargo de la Cátedra de Química Inorgánica y Orgánica. UNLPam
[2] Cátedra de Física Biológica. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam.
[3] Jefe de Trabajos Prácticos y Profesor Adjunto ad - honorem de la Cátedra de Introducción a la Biofísica. U. N. L. P.

RESUMEN

Se estudió la concentración de las distintas especies iónicas presentes en el líquido sinovial de bovinos. Las determinaciones efectuadas abarcaron la valoración de sodio, potasio, calcio, magnesio cloruros, fosfato inorgánico y bicarbonato. También Se realizó la valoración de las proteínas totales presentes en este fluido biológico. Debido a las diferentes concentraciones de aniones proteínatos correspondientes al líquido sinovial y al plasma sanguíneo de esta especie animal, es necesario suponer la existencia, en el estado estacionario, de un equilibrio de membrana de Donnan.

Palabras claves: Fluido Sinovial, Concentraciones Iónicas.

SUMMARY

The concentration of thedifferent ionic species containes in the synovial fluid of bovine has been investigated. Sodium, potasium, calcium, magnesium, chlorine, inorganic phosphate, bicarbonate as well as protein has been evaluated. More than four hundred experiments were performed. Owin to the different concentration of proteinates anions in the synovial fluid and in the serum, it may be concluded that a Donnan membrane equilibrium exist.

Key words: Synovil fluid, ionic concentrations

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se realiza con la finalidad de conocer las distintas especies iónicas contenidas en el líquido sinovial de bovinos y proceder a su valoración cuantitativa.

Esta es la primera parte de una serie de determinaciones fisicoquímicas, cuya ejecución fue programada a fin de establecer el valor de los parámetros bio - fisicoquímicos que condicionan el estado de este sistema "cerrado".

De esta forma deseamos brindar apoyo científico a lo realizado, en una forma un tanto empírica, pero exitosa, por profesionales veterinarios que intuitivamente han reemplazado el líquido sinovial de equinos por el correspondiente de bovinos, a fin de tratar diferentes afecciones articulares.

Nuestra idea es extender estas determinaciones a otras especies de animales domésticos y de ser posible hacer lo mismo con el líquido sinovial humano a fin de estudiar la posibilidad terapéutica para el tratamiento de diferentes afecciones articulares que padece el hombre.

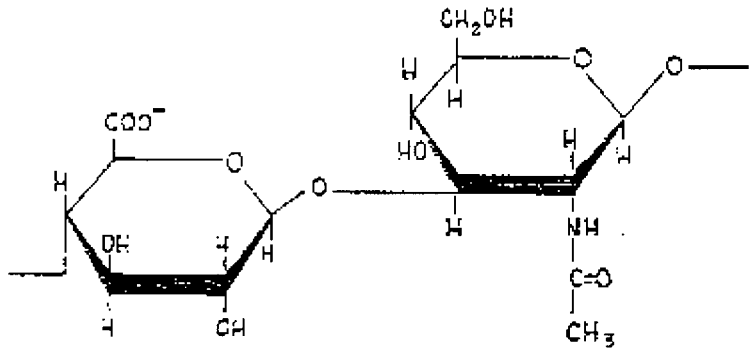
Comenzaremos en primer término por definir que se entiende por articulación: en el lenguaje cotidiano, el término "Articulación" indica un lugar donde dos partes se articulan entre sí (Del Prato I.O. 1971). En el sentido anatómico, se ha descripto una articulación como la "conexión subsistente en el esqueleto entre cualquiera de sus partes componentes rígidas, sean huesos o cartílagos"(Sisson-Grossman,1979).

Las articulaciones de los vertebrados poseen ciertas características estructurales y funcionales comunes. Teniendo en cuenta las primeras, las articulaciones pueden clasificarse en: fibrosas, cartilaginosas y sinoviales, siendo estas dos últimas sumamente importantes, tanto por sus funciones, como así también por el hecho de estar sujetas a la posibilidad de padecer enfermedades específicas.

En las articulaciones sinoviales, también llamadas diartrodiales, los huesos están unidos por una cápsula articular, y por ligamentos, pero separados por una cavidad. La cara interna de la cápsula articular está revestida por una membrana llamada membrana sinovial y es la que produce el líquido sinovial, el cual rellena la cavidad articular y lubrica la articulación.

La membrana sinovial, también llamada tejido sinovial, es un tejido conectivo vascular, similar a los tejidos conectivos del resto del cuerpo. Consta de elementos formes, células, fibras, junto con una sustancia denominada fundamental o matriz (Harper H.A. 1966). La membrana sinovial recubre la cara interna de la cápsula articular, pero no recubre el cartílago articular. El espacio extracelular de los tejidos animales está lleno de un material que tiene una consistencia parecida a la de un gel, que se llama matriz extracelular o sustancia básica, cuya función es mantener unidas las células.

Dicha matriz está compuesta por una compleja red de moléculas entrelazadas de heteropolisacáridos y proteínas fibrosas. Los heteropolisacáridos, denominados también glucosoaminoglucanos, son polímeros lineales compuestos por unidades repetitivas de disacáridos. El glucosoaminoglucano, ácido hialurónico de la matriz extracelular contiene unidades alternas de ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina como se ve en la figura 1. Se estima que el número de disacáridos por cadena es de aproximadamente 50.000. Debido al pH fisiológico el ácido hialurónico se encuentra como hialuronato (LehningerA.L. 1993).



ác. Glucurónico N Acetilglucosamina

Fig. 1 Unidad monomérica del ácido hialurónico

Los hialuronatos tienen masas moleculares superiores al millón. Sus disoluciones son claras y de elevada viscosidad lo que hace que actúe como un lubricante en el líquido sinovial de las articulaciones, líquido que es producido por la membrana sinovial.

El líquido sinovial es pegajoso y viscoso, muy parecido en su consistencia a la clara de huevo, dependiendo esta viscosidad, casi exclusivamente, de la presencia del ácido hialurónico, que cuando es precipitado con ácidos forma mucina. La viscosidad crece en forma exponencial con el incremento de la concentración del citado ácido, que al llegar al 1% forma geles.

Los otros constituyentes del líquido sinovial son los que se hallan normalmente en el plasma sanguíneo ya que este debe ser considerado como un dializado del plasma sanguíneo donde faltan solo las sustancias coagulantes. Presenta además unas pocas células, la mayoría mononucleadas, derivadas del tejido de revestimiento. La lubricación articular se considera como un ejemplo de lubricación por película líquida o flotación, siendo en realidad un tipo de lubricación hidrodinámica.

La condición esencial es la presencia de superficies de apoyo incongruentes. (Superficies articulares que no se coaptan perfectamente durante el movimiento). La incongruencia permite la formación de espacios cuneiformes ocupados por el líquido sinovial. Durante el movimiento el líquido sinovial circula por los espacios y como resultado del incremento de la presión intra-articular se mantienen las superficies articulares separadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) Obtención de la muestra.

El líquido sinovial se obtuvo de la articulación de la babilla (femoro-tibio-rotuliana) la cual fue abordada por la parte medial externa, a tres centímetros del borde de la rótula. En promedio se extrajeron entre cinco y siete cm^3 . (5 y 7 cm^3) por cada animal, empleándose para tal fin agujas 50/12 y jeringas de veinte cm^3 ($20cm^3$). El líquido obtenido era de aspecto claro y sumamente viscoso, el cual era colocado en tubos de ensayo con tapa de baquelita a rosca, evitándose en lo posible el contacto con el aire.

Todos los animales estudiados eran clínicamente sanos y la toma de muestra se realizó inmediatamente después de ser sacrificados. A continuación, todas las muestras fueron refrigeradas a dieciocho grados centígrados bajo cero (- 18,0 °C), temperatura esta que fue mantenida durante su transporte. En el laboratorio una vez alcanzada la temperatura ambiente, se procedió a su filtración a través de papel de filtro N° 0859 de la casa Schleicher und Schüll y posterior centrifugación a 4.000 r.p.m. durante media hora.

2) Determinaciones Químicas.

a) Determinación de iones sodio, potasio y cloruro. Se utilizó un equipo de Instrumentation Laboratory marca I. Lyte Na^+ K^+ Cl^- System. El mismo consiste en un analizador automático que emplea como sistema de medida electrodos ión-selectivos para las especies iónicas mencionadas. Los datos obtenidos figuran en la tabla 1.

b) Determinación de magnesio. Se utilizó el Merckotest para la determinación fotométrica. La valoración se basa en que el magnesio forma con el azul de xylidyl en medio alcalino un complejo de color rojo La concentración del complejo formado es proporcional a la concentración del magnesio presente en la muestra, la que finalmente se valora por fotometría de absorción a una longitud de onda de 505 nm. Como espectrofotómetro se utilizó el Metrolab, modelo 1.2.00. Muchas determinaciones se efectuaron también mediante el método complexo métrico empleandose la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) con la técnica de Kovacs y Tarnosky modificada por Insúa y Col y que fuera usada en anteriores trabajos realizados en nuestro laboratorio. Empleándose como indicador azul de eriocromo de la firma Geigy. Los datos obtenidos figuran en la tabla 1.

c) Determinación de calcio Como en el caso del magnesio muchas determinaciones se efectuaron mediante complex metría con E.D.T.A. anteriormente descripto para el magnesio. En otros casos se utilizó el analizador de calcio Tecnolab, modelo T411, que se basa en el empleo de un electrodo de medida del tipo ión-selectivo. Los datos obtenidos con ambas técnicas son, como en el caso del magnesio, dentro de los límites del error experimental satisfactoriamente coincidentes. Los valores obtenidos pueden verse en la tabla 1.

d) Valoración del fosfato inorgánico Se determinó espectrofotométricamente mediante el correspondiente Merckotest. La reacción se basa en que el fosfato inorgánico presente en el líquido sinovial reacciona con el molibdato de sodio formando un fosfomolibdato. Por reducción con sulfato de p- metilaminofenol el fosfomolibdato se transforma en azul de molibdeno coloidal, que resulta ser proporcional a la cantidad de fosfato inorgánico presente en la muestra. La determinación final se realiza por fotometría de absorción en la longitud de onda de 750 nm. Los datos obtenidos figuran en la tabla 1.

e) Determinación del bicarbonato Se empleó la técnica de Kolthoff y Sandel que consiste en efectuar la titulación con solu ción 0,01 N de hidróxido de sodio; empleándose como indicador solución hidroalcohólica de fenolftaleína al 2 %. Los valores hallados figuran en la tabla 1.

f) Determinación de proteínas totales Se basó en la conocida reacción del Biuret. Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico en medio alcalino de hidróxido de sodio dando un complejo de color violeta, con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales presentes en la muestra. Como instrumento se utilizó un espectrofotómetro U. V. Visible Recording Spectrophotometer SHIMADZU 160 A. Los datos encontrados figuran en la tabla 1

RESULTADOS OBTENIDOS

Con los datos que figuran en la tabla 1 se calculó el valor medio y la desviación standard correspondiente a cada una de las especies iónicas valoradas, en donde al estado de anión proteínato se incluye a las proteínas totales.

Los valores estadísticos que figuran en la tabla II fueron obtenidos mediante la aplicación del cálculo estadístico.

Del análisis de estos resultados surge que la concentración de sodio y potasio está comprendida dentro de los valores límites encontrados por otros autores para el plasma de esta especie animal, como se puede apreciar en la tabla III, donde se han incluido también los valores hallados en nuestro laboratorio correspondientes al humor vítreo de esta especie animal.En cuanto a los alcalinotérreos calcio y magnesio los valores obtenidos de 3,2 mEq/ℓ y 3,3mEq/ℓ respectivamente, resultan ser para el caso del ión calcio sensiblemente mas bajo que el correspondiente valor para el plasma, situación esta que, como es posible apreciar por los valores tabulados en la tabla III no se da para el magnesio.

En lo que respecta a los valores del ión cloruro los datos obtenidos concuerdan, dentro de los límites del error experimental y de las variaciones normales dentro de la misma especie, con los correspondientes al plasma sanguíneo, pero algo inferiores a los del humor vítreo.

Los valores correspondientes al bicarbonato resultan ser, como es de esperar superiores a los del plasma sanguíneo. En lo que hace a los fosfatos su valor de 4 mEq/ℓ es sensiblemente superior a los correspondientes al plasma sanguíneo y al humor vítreo de esta especie.

En lo que hace referencia al contenido en proteínas totales, expresado en nEq/ℓ, de acuerdo a lo indicado por Harper, su valor de 5,4 mEq/ℓ resulta ser, como es lógico esperar, sensiblemente menor (aproximadamente un 30 %) al del contenido plasmático.

CONCLUSIONES

De acuerdo con algunos autores(Harper H.A.,1966, LehningerA.L.,Nelson, D.L. 1993), el agua corporal puede dividirse en dos grandes compartimentos: uno que contiene el fluido extracelular y otro que involucra al fluido intracelular.

El extracelular puede a su vez subdividirse en plasma sanguíneo, fluido intersticial y un pequeño volumen de lo que se ha dado en llamar fluido transcelular, este último formado por la actividad secretora de distintas células, constituyendo el líquido cefalorraquídeo, los fluidos oculares (humor vítreo y acuoso) y el líquido sinovial, entre otros.

El plasma sanguíneo está separado del líquido intersticial y transcelular por una membrana de permeabilidad selectiva que permite el pasaje de sustancias de bajo peso molecular, pero que dificulta o impide la difusión de macromoléculas.

La interacción entre plasma sanguíneo y líquido intersticial o transcelular tiene lugar a nivel de la membrana endotelial de los capilares sanguíneos. Debido a las diferentes concentraciones de aniones proteínatos que presentan ambos fluidos (plasma sanguíneo/líquido sinovial), es forzosamente necesario suponer la existencia, en el estado estacionario, de un equilibrio de membrana.

Desde el punto de vista fisicoquímico es necesario tener en cuenta el equilibrio de membrana que se presenta cuando una membrana de permeabilidad selectiva (membrana hemipermeable o membrana semipermeable) separa dos soluciones en las cuales se encuentran presentes especies iónicas y moleculares que pueden atravesarla con facilidad y otras que por el contrario no pueden hacerlo o lo hacen con dificultad. Si la concentración de las especies no difusibles a cada lado de la membrana es distinta, cuando se alcanza el equilibrio, los dos fluidos difieren en lo que hace a la concentración de las especies difusibles. Esta situación es la que se observa al comparar los datos obtenidos para el líquido sinovial y los correspondientes al plasma sanguíneo de esta especie animal.

En efecto, este último líquido donde existe una alta concentración de polianiones no difusibles (proteínatos), muestra en virtud del equilibrio anteriormente mencionado, equilibrio de membrana de Donnan, una mayor concentración de las especies catiónicas difusibles que el líquido sinovial, mientras que en este último, donde la concentración de proteínatos es baja, es mayor la concentración de los aniones difusibles. En la tabla II se muestran las concentraciones de las principales especies iónicas contenidas en el plasma sanguíneo, humor vítreo y líquido sinovial de esta especie animal, que corrobora lo antes mencionado.

Por último, del análisis de los valores obtenidos, surge, como era lógico suponer, que el sistema "cerrado" que contiene al líquido sinovial, es, bajo el punto fisicoquímico, eléctricamente neutro ya que el equilibrio en el ionoproteínograma se alcanza como se indica a continuación:

Concentración de aniones en mEq/l	Concentración de cationes en mEq/l
Cloruro 105,0	Sodio 130,0
Fosfatos 4,0	Potasio 4,3
Bicarbonato 27,0	Calcio 3,2
Proteínatos 5,4	Magnesio 3,3
Total 141,4	Total 140,8

Como es posible apreciar, los datos correspondientes a la suma de las concentraciones de aniones (expresados en mEq/l) y cationes, expresados en la misma forma, concuerdan, dentro de los límites del error experimental, satisfactoriamente.

Tabla 1: Concentración de cationes y aniones del líquido sinovial de bovinos en mEq/l

Muestra	Ión Sodio	Ión Potasio	Ión Calcio	Ión Magnesio	Ión Cloruro	Fósforo inorgánico	Ión Bicarbonat	Proteínas Totales
1	129	4.3	3,30	2.23	111	4.05	29	5.22
2	132	4.4	3.38	2.49	108	5,40	31.5	5.95
3	130	4.8	3.32	2.39	109	3.24	24.4	4.91
4	138	3.2	3.36	2.32	111	1.35	25	4.98
5	136	4.5	3.38	2.91	110	1.62	26.2	5.35
6	134	4.6	3.52	2.69	116	2.57	23.6	5,10
7	140	4.7	2.98	2.15	114	2.77	23.8	6.08
8	122	3.7	2.76	2.44	109	3.87	28.4	3.89
9	126	4.2	2.97	2.71	106	3.98	31.6	5,10
10	128	4,0	2.74	3.45	109	4.97	31.8	6.92
11	124	3.6	3.85	3.07	116	3.28	24.2	4.37
12	125	4.2	3.92	3.45	117	4,10	24.4	6.32
13	126	4,0	3.74	3.08	109	4.86	25.2	6.07
14	124	3.6	3.85	3.74	102	4.46	25.4	6.19
15	131	4.2	3.92	3.95	105	2.86	24	6.32
16	130	5.2	2.86	2.09	106	3,80	24.2	3.89
17	128	3.8	2.82	3.43	94	3.59	23	5,10
18	125	4.4	2.98	2.92	109	3.54	22	4.74
19	124	4,0	3.62	3,30	106	4,40	26	4.54
20	126	4.3	2.96	3.17	102	4.81	22	3.52
21	124	4.6	3,60	3,40	98.7	2.65	24.4	6.32
22	120	4.8	2.97	2.77	100	4.67	25	5,10
23	128	4.4	3.42	3,40	98	4.76	25.4	5.95
24	137	3.8	2.87	3.17	94	4.03	29	4,30
25	132	3.7	2.92	3,40	96	3.31	30.5	6.03
26	128	4,0	3.38	2.62	90	3.23	30.8	6.37
27	137	4.1	3.36	3.22	89	3.83	32	6.07
28	128	5,0	3,40	3.33	88	5.56	31	5.64
29	130	4.8	3.38	2.97	94	4.05	30	4.98
30	132	4.3	3,30	3.46	105	5.01	30.8	6.32
31	131	5.03	3,60	3.84	106.7	5.23	25	7,70
32	133	4.84	2.94	3.76	107	5.62	28	7,60
33	133	4.41	3.21	3.48	104	5,20	25	8,60
34	135	4.44	3.43	3.56	108	4.98	26	6,60
35	134	4.87	3.06	4.28	108.6	3.65	22	8.45
36	129	4.65	3.78	3.72	103	3.39	28	4,60
37	135	5.24	3.61	4.36	108	3.33	30	6,60
38	133	4.63	3,60	4.32	108.7	3.53	36	3.74
39	131	4.54	2.82	3,40	105.5	4.07	26	3.55
40	128	4.52	2.94	3.44	102.9	4.12	28	4.15
41	134	5.12	3.21	3.72	108.7	3.12	34	4.11
42	133	4.68	3.09	3.96	106	2.96	24	4.32
43	131	4.54	2,90	4.12	106	3.11	32	5.01
44	135	4.74	3,30	4.68	107.6	107.6	31	4.32
45	128	4.15	2.98	4.32	108.6	108.6	24	5.01
46	127	3,70	2.94	3.78	103.9	103.9	23	5.13
47	121	3.73	3,20	3.34	103.5	103.5	22	4.11
48	134	4.23	3.48	3.13	109	109	26	3.35
49	132	3.87	3.32	3.74	109.2	109.2	28	6.12
50	134	3.92	3.34	3.53	108.5	108.5	24	4.79

Tabla II: Datos Estadísticos

Especie iónica	Valor medio (en mEq/l)	Desviación standard
Sodio	130	± 4
Potasio	4.3	± 0,4
Calcio	3.2	± 0,3
Magnesio	3.3	± 0,5
Otros	1.7	
Cloruros	105	± 6
Fósforo inorgánico	4	± 1
Bicarbonatos	27	± 3
Proteínas totales	5.4	± 1

Tabla III: Valores medios de la concentración de las distintas especies iónicas contenidas en el plasma sanguíneo, humor vítreo y liquido sinovial de bovinos, expresada en mEq/l

Especie iónica		Humor vítreo	Líquido sinovial
Sodio	142,0	142,0	130,0
Potasio	6.7	7,0	4.3
Calcio	10.8	3.2	3.2
Magnesio	2,0	3.1	3.3
Cloruro	111,0	128,0	105,0
Fosfatos		1.8	4,0
Bicarbonat	17,0	20,0	27,0
Prot. Tot.	17,0	0.7	5.4

BIBLIOGRAFÍA

1. Bancrof,H. Introducción a la Bioestadistica.Eudeba.Bs.As.1960,pag. 72.
2. Carrozza,J.S.W.,Noia,M.A.,De Vega,F., "Constantes Biofisicoquímicas del humor vitreo de bovinos. Parte I: Ionograma y poteinas totales". Rev de Med Vet. Bs-As. 36,1.1975.-
3. Carrozza, J.S.W.. Guglielmetti,E.M.C.. " Constantes biofisicoquimicas de humor vitreo de ovinos. Parte I. Ionograma y proteinas totales".Rev.de Med.Vet.Bs.As. 67 nº 3.1986.
4. Dukes,H.H.,Swenson,M.J., Fisiología de los Animales Domésticos. Ed.Aguilar, México 1966.pag. 926.
5. Harper, H.A.,Manual de química fisiológica.Ed.El Manual Moderno.Mexico.1966 . pag nº 365
6. Höver,R. Physical Chemistry of Cell and Tisues.Ed. Churchill Londres.1947.pag 67,69
7. Kolthoff,I.M.,Sandel,E.R.., Tratado de Química Analítica general e inorgánica. Ed. Niger.Bs.As.1948.pag. 665.

8. Insua,N.E., Arcondo, S.G.M. de Mohando Soto,N.P..Rev.Fac.de Vet.12,7. LaPlata 1963
9. Kovacs, G.S., Tarnosky, K.E..Journal Clin.Path. 13,2 1960.
10. Lehninger, A.L.,Nelson,D.L. Cox,M.M.,Principios de Bioquímica.Ed.Omega.2ª. Edic.1993. pag 308
11. Masoro, E.J.,Siegel,P.D. Acid-Bass Regulation: Its Physiology and Pathology. Cap I Ed. W B. Sunders Co. 1971
12. Moelwyn, Hughes,E.A. , Physical Chemistry, Cap I y XXI .Ed. Mc. Millan Co. 1964
13. White,A. Handler,P. Smith, E.L., Atetten,W.. Principles of Biochemistry, Cap. II .Ed Mc.Grew-Hill. 1959..-
14. Globe,H."Anatomía Aplicada al Bovino" Editorial Iica,1989.
15. Sisson, -Grossman "Anatomia de los Animales Domesticos" .1979.