

M.A. Noia<sup>1,2</sup>; F. Coll Cárdenas<sup>1</sup>; D. Olivera<sup>1</sup>; L. Marengo<sup>2</sup>; P. de la Sota<sup>1</sup>; S. Cura<sup>2</sup>; M. M. Anconetani<sup>2</sup>; G. González<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, 60 y 118, La Plata; <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam.

fcollcardenas@fcv.unlp.edu.ar

### Resumen

El humor vítreo es una sustancia transparente y gelatinosa, formada principalmente por agua, que se encuentra en la cavidad del ojo por detrás del cristalino, tratándose de un espacio avascular y cerrado. En medicina veterinaria, el análisis post-mortem de este líquido biológico puede servir para determinar diversos tipos de enfermedades metabólicas, renales y nutricionales. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el humor vítreo equino mediante la determinación de su densidad, viscosidad y tensión superficial, la concentración de proteínas, y los macrominerales Na, K, P, Ca y Mg. El humor vítreo fue obtenido de equinos sanos, sacrificados en el Frigorífico Indio Pampa. La densidad fue cuantificada a partir del método del picnómetro; el comportamiento reológico se estudió con el viscosímetro digital de rotación HAAKE, RS 600, y la tensión superficial mediante el método del anillo a partir del tensiómetro de Du Noüy. Las proteínas totales fueron determinadas por un método colorimétrico, técnica PROTI U/LCR (Weiner LAB), al igual que el contenido de P (técnica Fosfatemia, Weiner LAB); en tanto, los contenidos de Ca y Mg se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica y los de Na y K, por fotometría de llama. Los resultados de densidad, viscosidad y tensión superficial del líquido biológico estudiado a 20°C fueron de 1.0025 g.cm<sup>-3</sup>, 2.13 cp y 51.0045 dinas.cm<sup>-1</sup>, respectivamente y presentaron una buena correlación lineal con respecto a la temperatura. Los contenidos de proteínas, P, Na, K, Ca y Mg resultaron ser de 0.033 g. dl<sup>-1</sup>, 1.1200 g. dl<sup>-1</sup>, 151.82 mEq.l<sup>-1</sup>, 3.7200 mEq.l<sup>-1</sup>, 3.2125 mg dl<sup>-1</sup> y 1.5379 mg dl<sup>-1</sup>, respectivamente. Se puede concluir que a partir de la caracterización postmortem de este fluido orgánico, se podrá inferir el estado de salud antemortem de los equinos.

**Palabras claves:** humor vítreo, equinos, cons-

tantes fisicoquímicas, proteínas.

### Abstract

The humor vitreous is a transparent and gelatinous substance, composed primarily of water, which is located in the cavity of the eye behind the lens, in the case of an avascular area and closed. In veterinary medicine, the post-mortem analysis of the biological liquid can be used to identify various types of metabolic diseases, kidney and nutrition.. The objective of the present work was to characterize the vitreous equine by determining its density, viscosity and surface tension, the concentration of protein, Na, K, P, Ca and Mg. Vitreous humor was obtained from healthy horse, killed in the Fridge Indio Pampa. The density was quantified from the method of pycnometer; rheological behaviour was studied using the digital rotary viscometer HAAKE, RS 600, and surface tension by the method of the ring from tensiometer Du Noüy. Total proteins were determined by means of a quantitative colorimetric method, technique PROTI U/LCR (Weiner LAB.) at same that contents of P (technique Fosfatemia (Weiner LAB)); while the contents of Ca and Mg were determined by atomic absorption spectrometry and its of Na and K, by flame photometry. Results obtained for density, viscosity and surface tension were 1.0025 g.cm<sup>-3</sup>, 2.13 cp y 51.0045 dinas.cm<sup>-1</sup>, respectively and showed a good linear correlation with respect to temperature. Protein contents, P, Na, K, Ca and Mg were 0.033 g.dl<sup>-1</sup>, 1.1200 g. dl<sup>-1</sup>, 151.82 mEq.l<sup>-1</sup>, 3.7200 mEq.l<sup>-1</sup>, 3.2125 mgs dl<sup>-1</sup> and 1.5379 mgs dl<sup>-1</sup>, respectively. One can conclude that after the postmortem characterization of this organic fluid, it may infer the state of health of the horses antemortem.

**Key words:** Vitreous humor, horses, physico-chemical constants, proteins.



## Introducción

El humor vítreo es una sustancia transparente y gelatinosa, formada principalmente por agua, que se encuentra en la cavidad del ojo por detrás del cristalino, tratándose de un espacio avascular y cerrado. Tiene un volumen aproximado de 4 ml, constituyendo cerca de un 80% del globo ocular. Sin embargo, hace poco tiempo que se conoce su verdadera estructura e importancia (Mulla, 2005). Su estructura gelatinosa se mantiene unida por un fino tramado fibrilar, compuesto fundamentalmente por largas moléculas de proteoglicanos. Está compuesto en un 99% por agua, colágeno y ácido hialurónico. Su viscosidad disminuye de la periferia hacia el centro, reduciéndose aún más con la edad del animal. En adultos jóvenes un 80% es gel y un 20% líquido que contiene ácido hialurónico pero no fibrillas. Con la edad el volumen líquido del humor vítreo aumenta hasta el 50%.

El cuerpo vítreo es una matriz extracelular que contiene proteínas estructurales fibrilares asociadas con cantidades variables de ácido hialurónico y varios tipos de proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos (Swann, 1991). El colágeno es la principal proteína fibrilar del cuerpo vítreo, en especial del tipo II (Ayad and Weiss, 1984). El ácido hialurónico es el principal glicosaminoglicano presente en el humor. Este es un biomaterial viscoelástico, componente importante del humor vítreo y líquido sinovial de las articulaciones. Tiene propiedades reológicas únicas que no tienen los polímeros sintéticos. Estas propiedades únicas indican el uso potencial del ácido como una ayuda quirúrgica, especialmente para la sustitución del humor vítreo natural en los procedimientos oftálmicos. Los aminoácidos libres están presentes en concentraciones mucho más pequeñas que en las que se encuentran en el plasma, y las glicoproteínas, contienen una menor cantidad de carbohidratos (Mulla, 2005).

El humor vítreo contiene además, urea, creatinina, sodio, potasio, calcio, magnesio, cloro y fósforo. Las concentraciones químicas y las propiedades físicas son generalmente más es-

tables a bajas temperaturas (McLaughlin and McLaughlin, 1988), siendo también menos susceptible de contaminación.

En medicina veterinaria, la aplicación más frecuente de estos análisis post-mortem puede servir para determinar diversos tipos de enfermedades metabólicas, renales y nutricionales (Varela and Bossart, 2005); pudiéndose hacer una extrapolación de las concentraciones antemortem y la correlación con la concentración de algunos electrolitos en el suero. Puede ser considerado para determinar, por ejemplo, la magnesemia antemortem, ya que el humor vítreo permanece sin cambios hasta 48 h postmortem (Ramírez et al., 1998). Otros líquidos biológicos, en tanto, tales como la sangre, orina o líquido cerebroespinal, son más susceptibles a sufrir cambios postmortem, debido a contaminación bacteriana, liberación de sustancias químicas intracelulares y metabolismo postmortem de los productos químicos (McLaughlin and McLaughlin, 1988).

Los objetivos del presente trabajo fueron determinar las constantes fisicoquímicas (densidad, viscosidad y tensión superficial) como también la concentración de proteínas, sodio (Na), calcio (Ca), fósforo (P), potasio (K) y magnesio (Mg) del humor vítreo, extraído en forma postmortem de equinos sanos, con el fin de caracterizarlo.

## Materiales y Métodos

### Obtención de las muestras

El humor vítreo fue obtenido de equinos sanos, sacrificados en el Frigorífico Indio Pampa, Establecimiento Oficial N° 51, de la ciudad de Trenque Lauquen de la Provincia de Buenos Aires.

En la sala de faena, se practicó la enucleación del globo ocular, el cual se conservó a  $-18 \pm 0.1^\circ\text{C}$  en freezer (Fig. 1a).

En el laboratorio, el globo ocular fue incidido en la zona media, para permitir de esta forma la separación del humor acuoso, cristalino y humor vítreo (Fig. 1b).

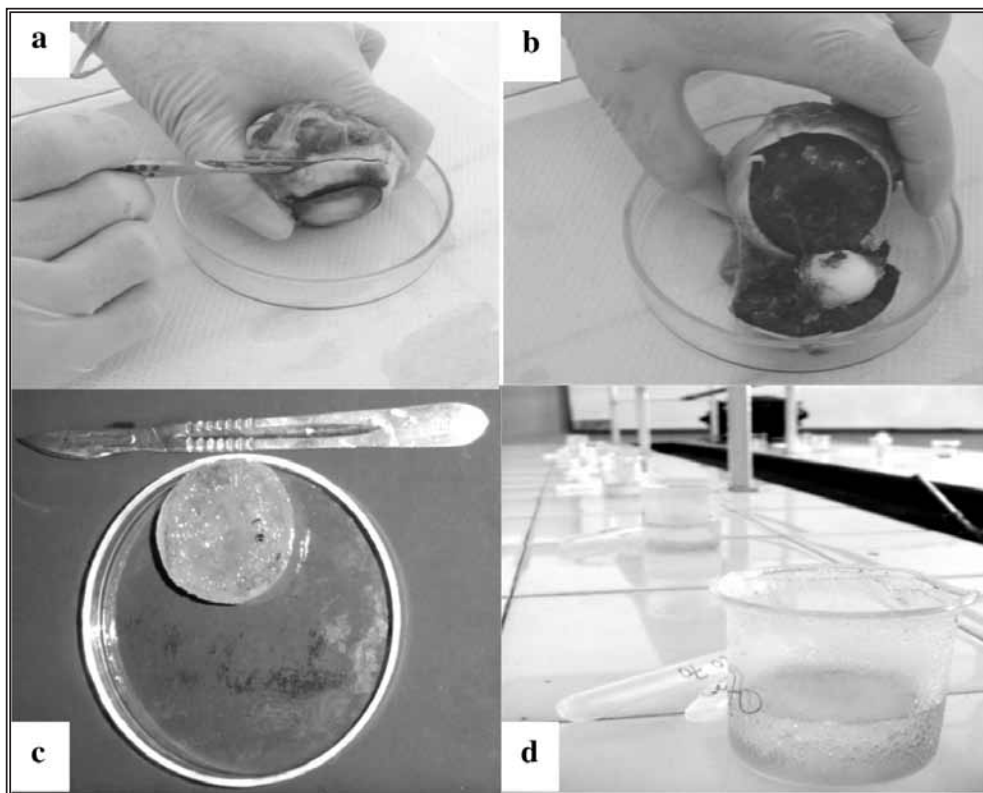
Este último, finalmente, fue descongelado for-



mando un pool (Fig. 1c). Luego, el líquido fue centrifugado 30 minutos a 5000 rpm a fin de

quedar libre de membranas y fibras hialinas (Fig. 1d).

**Fig. 1.** Extracción y posteriores tratamientos del humor vítreo equino. a) Enucleación del globo ocular de equinos. b) Separación de los humores acuoso, cristalino y humor vítreo. c) Separación del humor vítreo. d) Humor vítreo, luego de descongelado y centrifugado.



### **Densidad**

Se determinó la densidad del humor vítreo de los equinos a partir del método del picnómetro (Kolthoff and Sandell, 1988).

Para esta determinación se utilizó un picnómetro de 5ml, realizándose las diferentes determinaciones tras sucesivas pesadas mediante una balanza analítica de precisión Metler, modelo H35AR.

El humor vítreo fue sometido a una serie de temperaturas, en un rango entre 20 a  $40^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , a intervalos de  $5^{\circ}\text{C}$ . La constancia térmica se logró a partir de un baño termostático.

### **Viscosidad**

El comportamiento reológico de las muestras de humor vítreo de equino se estudió con un viscosímetro digital de rotación HAAKE, RS 600, Rheostress, que lleva incorporado el sistema M5/NV (Martín-Viaña, y col., 2002). Se

trabajó en ambiente termostatzado realizándose las determinaciones dentro del rango de las temperaturas de estudio ( $20$  a  $40^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ) y se utilizó un programa computarizado denominado Rotovisco Versión 2.3 HAAKE para adquirir y analizar los datos obtenidos.

### **Tensión Superficial**

La tensión superficial se cuantificó mediante la técnica del anillo empleando el tensiómetro de Du Noüy, modelo CSC (70535), el cual trabaja con una sensibilidad de 0.1 dinas/cm. Se mantuvo el mismo rango de temperaturas para las determinaciones ( $20$ - $40^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ), controladas a partir de un baño termostático.

### **Proteínas totales**

La determinación de proteínas totales se realizó mediante la técnica colorimétrica PROTI U/LCR (Weiner LAB.).



Las Proteínas totales presentes en la muestra reaccionan en medio ácido con el complejo Rojo de Pirogalol-Molibdato originando un nuevo complejo que se cuantifica por espectrofotometría a 600 nm.

### **Determinación de Ca y Mg**

Los contenidos de Ca y Mg se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica, después de la dilución de las muestras 1:50 en CaCl<sub>2</sub> al 0.2%, en el Laboratorio de Nutrición Mineral de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

### **Determinación de Na y K**

Los contenidos de Na y K se determinaron mediante un fotómetro de llama (Metrolab). El Fotómetro de llama es, como su nombre lo indica (photos = luz, metro, medir), un instrumento capaz de medir la luz emitida por una llama en la que interviene el ion a analizar. Cada metal, calentado sobre una llama de mechero en determinadas condiciones, produce un color característico. Así, un compuesto de Sodio expuesto sobre un hilo de Platino, sobre una llama, produce un color amarillo – anaranjado; en tanto, el Potasio produce una coloración violeta. Este efecto es utilizado por el fotómetro de llama para determinar la concentración de una solución desconocida, luego de calibrar el aparato con una solución cuya concentración se conoce (Botta, 2007). La sensibilidad del fotómetro de llama es de 23 mg/L.

### **Determinación de P**

La determinación de P se realizó mediante la técnica fosfemia (Weiner LAB.), empleando un método colorimétrico.

El Fósforo inorgánico reacciona en medio ácido con el molibdato, que es reducido por el ácido ascórbico a azul de molibdeno, desa-

rollándose el color en medio arsenito/citrato. El arsenito/citrato se combina con el exceso de molibdato impidiendo su reacción posterior con el fosfato liberado de esteres lábiles. El color obtenido se mide entre 620 y 650 nm.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Un total de 35 muestras de humor vítreo de equinos sanos fue analizado, determinándose la densidad, la viscosidad y la tensión superficial de estas muestras, luego de exponerlas a diferentes temperaturas, dentro de un rango de 20 a 40°C±0.1°C. Cada experimento fue realizado por duplicado. También se determinó en cada una de ellas, la concentración de proteínas totales, P, Na, K, Ca y Mg.

El análisis de la varianza y el test de Fisher (LSD) fueron aplicados con un nivel de significación de 0.05 y 0.01. Se utilizó el programa estadístico SYSTAT (Systat Inc., version 5.0).

### **Resultados**

#### *Densidad*

Los resultados de las determinaciones de la densidad absoluta del humor vítreo a las diferentes temperaturas de estudio, se presentan en la Tabla 1.

El valor de la densidad absoluta a 20°C resultó de 1,0026 g.cm<sup>-3</sup>, siendo comparable a los hallados para ovinos y bovinos para la misma determinación, aunque levemente inferior (Frígoli et al., 1990).

A partir de los datos obtenidos a las diferentes temperaturas ensayadas, podemos observar además, una marcada dependencia lineal de la densidad absoluta con la temperatura (r<sup>2</sup>=0.84), en donde a medida que aumentó este último parámetro, el valor de la densidad fue en franca disminución, comportamiento esperable para los líquidos (Potter, 2002).

**Tabla 1.** Determinación de la densidad absoluta del humor vítreo de equinos..

TEMPERATURA (°C)	DENSIDAD ABSOLUTA (g.cm <sup>-3</sup> )
20	1.0026
25	0.9992
30	0.9972
35	0.9967
40	0.9872

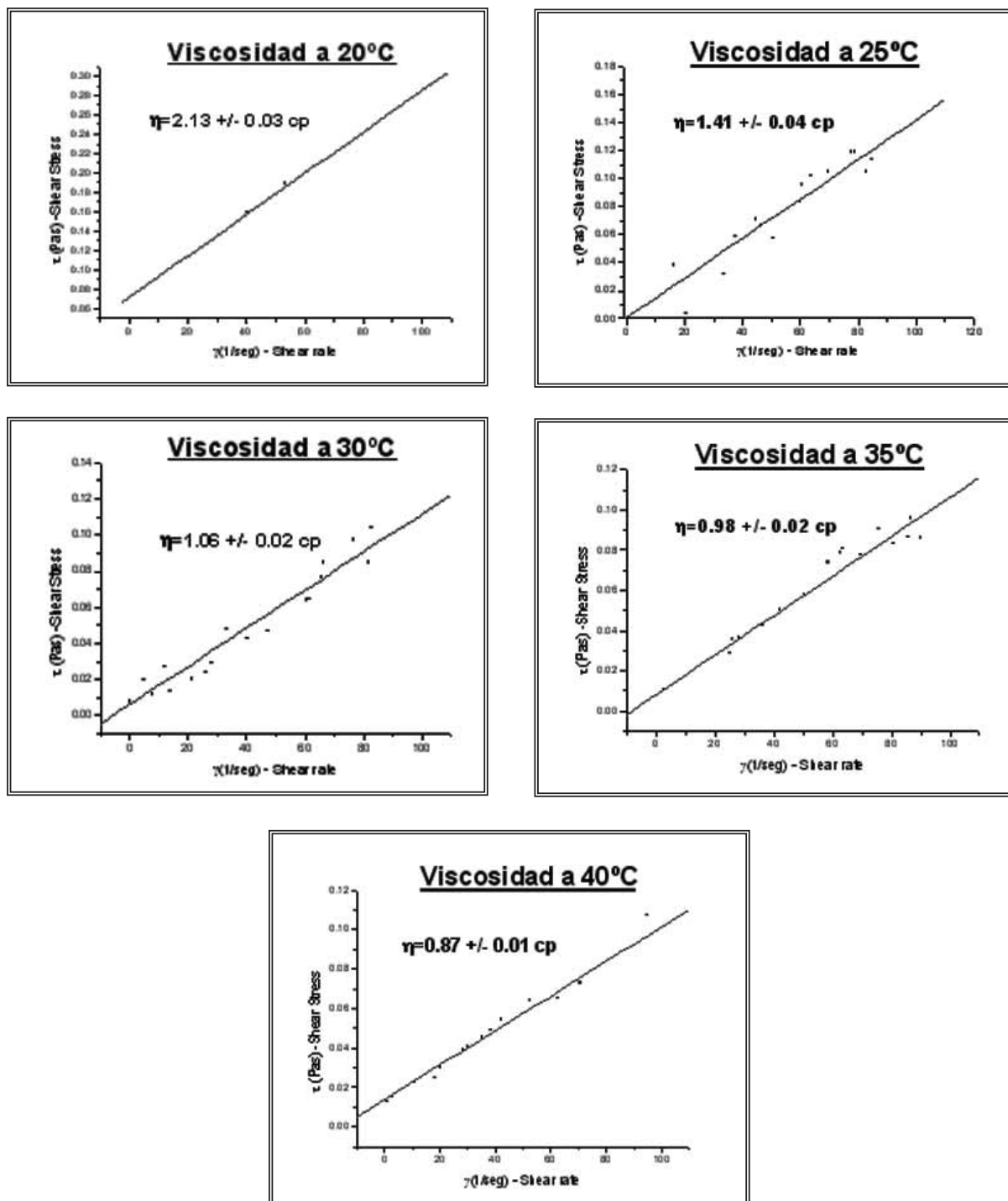


### Viscosidad

A partir de los ensayos reológicos dinámicos, curvas de esfuerzo versus velocidad de deformación, se obtuvieron los valores de viscosidad dinámica a las distintas temperaturas ensayadas. Para 20°C, el

parámetro en estudio resultó de 2,18 cp, valor que disminuyó con el incremento de la temperatura.

Las curvas reológicas se presentan en la Figura 2 (a, b, c, d y e), para cada temperatura ensayada.



**Fig. 2:** Representaciones Gráficas de las viscosidades dinámicas del humor vítreo de equinos a las diferentes temperaturas. a (20°C); b (25°C); c (30°C); d (35°C) y e (40°C). Los puntos indican los resultados experimentales.



### Tensión Superficial

Las tensiones superficiales resultantes, a las distintas temperaturas ensayadas se presentan en la Tabla 2. El valor para la tensión superficial del humor vítreo de equino a 20°C resultó de 51.0025 dinas.cm-1. Dicho parámetro presentó, al igual que la densidad y la viscosidad dinámica, una dependencia lineal con la temperatura. Cabe destacar que los valores infor-

mados son los obtenidos a partir de las correcciones correspondientes entre los resultados de las tensiones superficiales medidas (P) y el factor de corrección (F).

Con respecto a la dependencia con la temperatura mencionada se debe hacer hincapié que a medida que este parámetro fue en franco aumento, el resultado de la tensión superficial real fue descendiendo.

**Tabla 2.** Determinación de la tensión superficial de humor vítreo de equinos.

TEMPERATURA (°C)	TENSION SUPERFICIAL (dinas.cm-1 )
20	1.0026
25	0.9992
30	0.9972
35	0.9967
40	0.9872

Efecto de la temperatura sobre la densidad, la viscosidad y la tensión superficial del humor vítreo de equinos

El efecto de la temperatura sobre los parámetros físicos determinados fue interpretado mediante la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \cdot \exp(-E_a/RT) \quad (1)$$

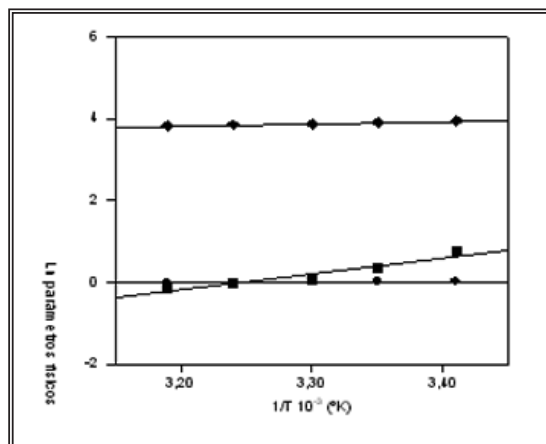
donde T es la temperatura en °K, E<sub>a</sub> es la energía de activación (Joule/mol), A es un factor preexponencial y R es la constante de los gases 8.31 (Joule/°K mol). La Energía de activación (E<sub>a</sub>) puede ser considerada como la sensibilidad del humor vítreo frente a los cambios térmicos.

Aplicando logaritmos naturales a ambos miembros de la ecuación (1) se obtiene:

$$\ln k = \ln A - E_a/RT \quad (2)$$

ésta última expresión corresponde a la ecuación de una recta que no pasa por el origen del sistema de coordenadas y cuya pendiente se obtiene al representar el ln de k en función de 1/T.

En la Figura 3 se observan los gráficos obtenidos al aplicar esta ecuación en relación a los parámetros densidad, viscosidad y tensión superficial del humor vítreo de equinos. Podemos observar que existe una correcta relación entre la variación de la temperatura y los parámetros físicos determinados. En todos los casos se observó un buen coeficiente de correlación r<sup>2</sup> (densidad: 0.84; viscosidad: 0.90; tensión superficial: 0.98).



**Fig. 3:** Aplicación del modelo de Arrhenius para evaluar el efecto de la temperatura sobre los parámetros físicos de densidad (○), viscosidad (□) y tensión superficial (△) del humor vítreo de equinos.

Proteínas Totales, Ca, Na, K, Mg y P:  
 Los resultados promedio de las determinaciones de proteínas totales, Ca, Na, P, K y Mg

hallados a partir de las muestras de humor vítreo equino se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Determinación de las proteínas totales, Ca y Mg de humor vítreo de equinos.

	<b>Proteínas (g.dl-1)</b>	<b>Calcio (mg. dl-1)</b>	<b>Magnesio (mg. dl-1)</b>	<b>Sodio (mEq. l-1)</b>	<b>Potasio (mEq.l-1)</b>	<b>Fósforo (mg. dl-1)</b>
Promedio	0.0330	3.2125	1.5379	151,82	3,7200	1,1200
S.D.	0.0061	0.8754	0.2254	21,8578	0,7416	0,5939

Los resultados obtenidos se compararon con los realizados en experiencias anteriores en otras especies animales (Tabla 4). Se puede observar que para el caso de las proteínas, el humor vítreo de los equinos resultó tener el valor más bajo (0.033 g dl-1), al igual que para los contenidos de K y P (3.7200 mEq.l-1 y 1.12 mg dl-1, respectivamente). Los contenidos de

Na del humor vítreo equino resultaron ser los mayores con respecto a las demás especies (151.8 mEq.l-1). En tanto para el caso de los electrolitos Ca y Mg, los valores presentados en este fluido orgánico, resultaron intermedios con respecto a los de las demás especies pecuarias comparadas (3.2125 mg dl-1 para el Ca y 1.5379 mg dl-1, para el Mg).

**Tabla 4.** Comparación de los resultados promedios de proteínas totales, Na, K, P, Ca y Mg de humor vítreo de equinos, bovinos, ovinos y porcinos.

	<b>Humor vítreo equino</b>	<b>Humor vítreo bovino</b>	<b>Humor vítreo ovino</b>	<b>Humor vítreo porcino</b>
Proteínas (g. dl-1)	0.033	0.070	0.064	0.054
Calcio (mg. dl-1)	3.212	3.200	2.600	4.100
Magnesio (mg. dl-1)	1.537	3.100	2.600	1.320
Sodio (mEq. l-1)	151.8	142.0	141.0	135.0
Potasio (mEq. l-1)	3.7200	7.000	4.800	5.100
Fósforo (mg. dl-1)	1.120	1.800	4.300	2.100

### Conclusiones

Los resultados obtenidos para la densidad absoluta del humor vítreo de equinos fueron inferiores a los presentados por ovinos y bovinos para la misma determinación, dentro del mismo rango de temperaturas.

En cuanto a la viscosidad dinámica mostró una clara dependencia con la variación de la temperatura al igual que para el caso de la tensión superficial.

Las distintas muestras analizadas presentaron valores semejantes entre sí para las determi-

naciones químicas de proteínas totales y el ionograma realizado, brindando así un reflejo del estado de salud que presentaban los animales muestreados.

Se puede concluir que a partir de la caracterización postmortem de este fluido orgánico, se podrá inferir el estado de salud antemortem de los equinos.



## Bibliografía

- Ayad, S.; Weiss, J.B. 1984.** A new look at vitreous-humour collagen. *Biochemical Journal*, 218: 835-840.
- Botta, R. 2007.** La aplicación de la química analítica y la electromedicina en la determinación del intervalo postmortem. [www.criminologia.com.es](http://www.criminologia.com.es)
- Frígoli, A.; Carrozza, J.; Noia, M. 1990.** Constantes Bio-Físicoquímicas del humor vítreo de ovinos. Parte III. Densidad y pH en función de la temperatura. *Revista Medicina Veterinaria*, 71, 3, 132-136.
- Kolthoff, I.M. y Sandell, E.J. 1988.** Quantitative Chemical Analysis. Edit NIGAR. Edición 1988.
- Martín-Viaña, N.; Morales Lacarrere, I.; Cordovés, Y. 2002.** Uso de la reología en la evaluación de la jalea dentífrica fluida. *Revista Cubana Farmacología*, 36(1):21-27
- McLaughlin, B.G.; McLaughlin, P.S. 1988.** Equine vitreous humor Chemicals concentrations: correlation with serum concentrations, and post-mortem changes with time and temperature. *Canadian Journal Veterinary Research*, 52: 476-80.
- Mulla, A. 2005.** Role of vitreous humor biochemistry In forensic pathology. Thesis. Department of Pathology, College of Medicine, University of Saskatchewan.
- Potter, M.; Wiggeri, D.; Hondzo, M.; Shih, T. 2002.** Mecánica de fluidos- 3B Edición. Publicado por Cengage Learning Editores. Capítulo I.
- Ramírez, C.; Tittarelli, C.; Mattioli G.; Lasta, G. 1998.** Empleo del humor vítreo para la estimación postmortem de la magnesemia en bovinos. *Archivos Medicina Veterinaria*, 30, 1: 157-160.
- Steffe, J. F. 1996.** Rheological methods in food processing engineering, (2nd Ed.). Freeman Press, MI.
- Swann, D.A. 1991.** Biochemistry of the vitreous. In: Schepens CL, Neetens A. The vitreous and vitreoretinal interface. Belgium: Springer-Verlag; 59-72.
- Varela, R.; Bossart, G. 2005.** Evaluation of biochemical analytes in vitreous humor collected after death in West Indian manatees. *Journal American Veterinary Medical Association*, 226, 1: 88-92.

