

**Artigo Original**

Recebido em 07/01/2002 e aceito em 25/10/2003

**Posible rol del contenido  
iónico y pH plasmáticos sobre  
la electroafinidad endotelial**

*Possible role of plasmatic pH and ionic  
content on endothelial electroaffinity*

**MSc. Silvia E. Rodrigo**

Gabinete de Tecnología Médica  
Facultad de Ingeniería  
Universidad Nacional de San Juan  
Av. Lib. San Martín 1109 (o)  
San Juan (5400), Argentina  
e-mail: srodrigo@gateme.unsj.edu.ar

**Dr. Ricardo L. Armentano**

Facultad de Ingeniería, Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad Favaloro  
Av. Belgrano 1723. C1093AAF, Argentina  
e-mail: armen@favaloro.edu.ar

**Dr. Jaime Levenson**

Centre de Medecine Preventive Cardiovasculaire  
Hôpital Broussais  
96 Rue Didot, 75674 Paris cedex 14, França  
e-mail: levenso@worldnet.fr

**Resumen**

La aterosclerosis es un proceso multifactorial de gran complejidad cuyo origen es aún desconocido. Sin embargo, eventos característicos de su patogénesis dan evidencias de una disminución de la densidad de carga eléctrica exhibida normalmente por el glicocáliz de los elementos parietales y sanguíneos implicados en este proceso. Las investigaciones más recientes indican que el espesor del glicocáliz endotelial es función no sólo de sus moléculas polianiónicas superficiales, sino también de la composición del fluido sanguíneo. Teniendo en cuenta esta dependencia respecto de la composición de la sangre, el objetivo de este trabajo fue investigar la influencia de la concentración electrolítica y del pH plasmáticos sobre las propiedades electrocinéticas en la interfase pared arterial – fluido sanguíneo. Para lograr esto se evaluó experimentalmente utilizando segmentos aórticos porcinos, el efecto electrocinético que ejerce sobre el endotelio arterial, el flujo de soluciones de contenido iónico y pH variables. Los resultados indicaron que el aumento del contenido iónico normal del plasma podría afectar las propiedades eléctricas de aquellos elementos, favoreciendo su acercamiento. Así también, el decremento del valor del pH fisiológico reduciría la proporción de moléculas polianiónicas contenidas en el glicocáliz de dichos elementos, disminuyendo la repulsión electrostática entre ellos. De esta forma, el desarrollo aterogénico asociado con un aumento de la captación de componentes de la sangre, podría estar relacionado con una alteración de las propiedades electrocinéticas de los elementos parietales y sanguíneos involucrados, provocada por cambios de pH o concentración electrolítica plasmática.

**Palabras clave:** Aterosclerosis, Intensidad iónica, pH plasmático, Propiedades electrocinéticas.

**Abstract**

It is well known that atherosclerosis is a multifactorial process of great complexity whose origin is yet unknown. However, characteristic events implicated in its pathogenesis give evidences of a decrease of the electric charge density normally exhibited by glycocalyx of wall and blood elements implicated in this process. Recent evidence indicates that endothelial glycocalyx thickness depends not only on its superficial polyanionic molecules, but also on the blood fluid composition.

Taking into account this dependence with respect to blood composition, the objective of this work was to investigate the effect of plasmatic pH and electrolytic concentration on electrokinetic properties of arterial wall - blood fluid interface. For this purpose, we experimentally evaluated utilizing porcine aortic segments, the electrokinetic effects exerted on arterial endothelium, by the flow of variable pH and ionic content solutions. The results indicated that the increase of normal plasmatic ionic content would affect the electrical properties of such elements, thus helping their approaching. Likewise, the diminution of physiological pH value would decrease the polyanionic molecule number contained in the glycocalyx of such elements, thus reducing electrostatic repulsion force between them. In this way, the atherogenic development associated with an increased uptake of blood macromolecules might be related with an alteration of electrokinetic properties of the above wall and blood elements, caused by changes of plasmatic pH or electrolytic concentration.

**Keywords:** Atherosclerosis, Electrokinetic properties, Ionic strength, Plasmatic pH.

**Extended Abstract****Introduction**

Characteristic events related with initial atherogenic development show an alteration of electrical charge density normally exhibited by the glycocalyx of wall and blood elements involved. Recent evidence indicates that endothelial glycocalyx thickness is function not only on its superficial anionic groups, but also on the blood fluid composition. Taking into account this dependence with respect to blood composition, the objective of our investigation was to try to elucidate the possible role of plasmatic pH or electrolytic concentration value, as the cause of electric charge properties modification of the above mentioned elements, typical alteration in atherogenic stages.

**Materials and Methods**

To attain our objective we evaluated experimentally utilizing porcine aortic segments, the effect of solution flow of different pH and ionic content on electrokinetic properties of arterial endothelium - perfusion solution interface. For this purposes a hermetic cylindrical experimentation cell, which permits to measure electrokinetic potential on arterial endothelium through the streaming potential technique, was designed. We choose as base perfusion solution Roux Ocefa apyrogenic Ringer solution (pH corrected to 7.4), taking into account the results of Sawyer and collaborators

with respect to the importance of a ionic content equivalent to plasma in general and the presence of  $K^+$  and  $Ca^{++}$  cations in particular for the integrity of the endothelial charge structure. Two series of measures were effected utilizing four aortic segments in each case; in first place we determined the streaming potential corresponding to NaCl dissolutions (concentrations between 0.015 and 0.215 mol/dm<sup>3</sup>), obtained gradually incorporating NaCl pro-analysis to base Ringer solution. In second place we measured the streaming potential for bath pH changes (ranging between 5.8 and 8), adding in small fractions dissolutions 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl and 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH to base Ringer solution. Starting from these measurements, we then estimate the mean values of zeta potential and electrical charge density corresponding to endothelial surface. In addition, two porcine aorta incubated in neuraminidase solution during one hour were used to estimate the contribution of sialic acid molecules to endothelial charge properties.

**Results**

In all arterial segments perfused with solutions of different ionic concentration and pH, we observed linear increase of streaming potential values with  $\Delta P$  (between 1333 y 6665 Pa). At the same time on this linear range,  $\Delta P$  is proportional to solution flow, and thus a laminar regimen through the channel is established. For this linear range the results indicated a negative correlation with electrolytic concentration solution of the estimated mean values of zeta potential and electrical charge density of the endothelium, as well as of the ionic atmosphere thickness adjacent to endothelial membrane. Likewise, a parallel variation between pH solution and the estimations of mean values of endothelial zeta potential and charge density was observed. Discussion: Taking into account our results, we can suppose that while greater the plasmatic electrolytic content, the more effective electrostatic screening of such wall and blood elements, thus helping its approximation. Furthermore, a plasmatic pH decrease could reduce the anionic molecules number that normally establish the negative charge density on the surface of those wall and blood elements. This phenomenon would decrease the electrostatic repulsive force between them, thus facilitating their proximity. In this way, plasmatic pH or electrolytic concentration variations could affect the endothelial electroaffinity degree with respect to the blood components that participate in the initial atherogenic development. Although our experimental work does not permit us to explain the phenomena that take place in vivo in the interface object of our study, the actual significance of these observations suggests a new focus for investigators attempting to elucidate the role of plasmatic pH and ionic content in atherogenesis.

## Introducción

Dos eventos asociados con la disfunción endotelial inicial típica de la aterogénesis (Gimbrone, 1980; Gimbrone y Topper, 1999), son una mayor permeabilidad endotelial a las lipoproteínas de baja densidad (Sprague *et al.*, 1988; Orekhov *et al.*, 1992) y una proporción aumentada de glóbulos blancos mononucleares en las cercanías de la íntima arterial afectada (Østerud, 1997; Giuffré *et al.*, 1997). Entre las diversas teorías propuestas para explicar este último fenómeno, una de ellas sostiene que uno de los factores que posiblemente determina el acercamiento y adhesión inicial de monocitos en el endotelio intacto es la alteración del glicocáliz que exhiben normalmente estas células sanguíneas, la íntima arterial o ambas (Schwartz *et al.*, 1980; 1985a; 1985b). Las evidencias más recientes indican que el espesor del glicocáliz endotelial es función no sólo de sus moléculas aniónicas superficiales, sino también de la composición y condiciones hemodinámicas del fluido sanguíneo (Spaan *et al.*, 1999). Considerando específicamente esta dependencia de la composición de la sangre, cabe suponer que los sucesos mencionados podrían a su vez estar relacionados con una alteración local del pH o de la concentración electrolítica del plasma. Se conoce que al pH fisiológico, la mayor parte de los carbohidratos localizados en la superficie celular (principalmente residuos de ácido siálico (AS) y especies particulares de glicosaminoglicanos (GSG)) están ionizados negativamente. Sin embargo, dado que las macromoléculas biológicas contienen diferentes grupos ionizables a distintos valores de pH, cualquier variación de este parámetro afecta el grado de ionización de cada una de ellas y por lo tanto, su densidad de carga superficial (Eylar *et al.*, 1962; Danon *et al.*, 1972). Por su parte, un cambio en la concentración electrolítica del plasma podría modificar las propiedades eléctricas de tales grupos aniónicos, debido a una redistribución de cargas en la superficie de las células bañadas por él (Stryer, 1988; Smith y Wood, 1997).

Partiendo de este conocimiento y teniendo en cuenta que en condiciones fisiológicas normales no se produce en general la adhesión de elementos sanguíneos en el vaso, nuestra investigación estuvo orientada a tratar de esclarecer el posible rol de la variación de pH o de la concentración iónica plasmática en contacto con el segmento arterial afectado como causa de la modificación típica en estados aterogénicos, de la densidad de carga eléctrica exhibida normalmente por los componentes parietales y sanguíneos implicados. Para lograr esto se evaluó experimentalmente utilizando segmentos aórticos porcinos, el efecto del flujo

de soluciones de composición iónica diferente, sobre las propiedades electrocinéticas en la interfase endotelio arterial – solución electrolítica.

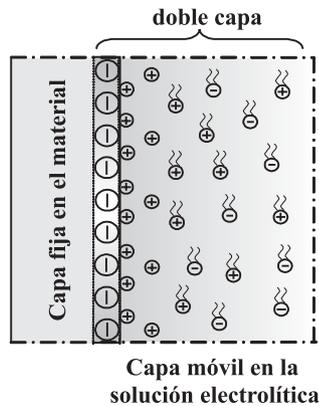
La determinación de dichas propiedades electrocinéticas está basada en la teoría de las soluciones coloidales, que define la interacción eléctrica entre superficies macromoleculares ionizadas y los electrolitos de la solución en la cual están inmersas. Esto da origen a una doble capa eléctrica en la interfase material – electrolito, formada por la carga fija establecida en la superficie y los pequeños iones móviles (contraiones) de la solución, atraídos electrostáticamente por el material cargado; un modelo simplificado de este fenómeno está representado en la Figura 1. Si además se aplica una diferencia de presión a la solución electrolítica, ésta comenzará a fluir provocando el desplazamiento parcial de las cargas móviles y generando en la interfase considerada, un potencial electrocinético conocido como potencial zeta, designado  $\xi$  en la Figura 2. La magnitud de esta diferencia de tensión eléctrica dependerá no sólo de la densidad de carga exhibida por el material, sino también de su decaimiento con la distancia por efecto de la capa de contraiones de la solución (Verwey y Overbeek, 1948; Davies y Rideal, 1963). De acuerdo con el modelo de Gouy – Chapman de la doble capa eléctrica para una superficie macromolecular plana e impermeable (Glasstone, 1942; Forker, 1971), el potencial zeta  $\xi$  (V) puede aproximarse según la ecuación de Poisson – Boltzmann generalizada, como:

$$\xi = \frac{2KT}{e} \sinh^{-1} \left( \frac{2\pi e \sigma}{\kappa DK T} \right) \quad (1)$$

siendo  $K$ : constante de Boltzmann (Joule/°K);  $e$ : carga electrónica (C);  $T$ : temperatura absoluta (°K);  $\sigma$ : densidad de carga superficial promedio (C/m<sup>2</sup>);  $D$ : constante dieléctrica del medio y  $\kappa$ : inversa del espesor de la capa de contraiones adyacente al material ionizado (1/m).

Además, tanto el potencial interfacial  $\Psi_0$  generado por la densidad de carga en la superficie macromolecular, como el potencial zeta correspondiente, están afectados por las variaciones de  $\kappa$ , función a su vez de la concentración  $c_i$  de cada especie iónica  $i$ , y de su valencia  $z_i$  (Jirgensons, 1958; Levine *et al.*, 1983; Atkins, 1991; Levine, 1998; Mestel *et al.*, 1998) de acuerdo con:

$$\kappa = \frac{1}{r} = 3.56 \times 10^9 \sqrt{\frac{1/2 \sum c_i z_i^2}{DT}} = 3.56 \times 10^9 \sqrt{\frac{I}{DT}} \quad (2)$$



**Figura 1.** Modelo de la doble capa electroquímica y del flujo de contraiones, para un material ionizado negativamente. **Figure 1.** Model of electrochemical double layer and contraions flow, for a negatively ionized material.

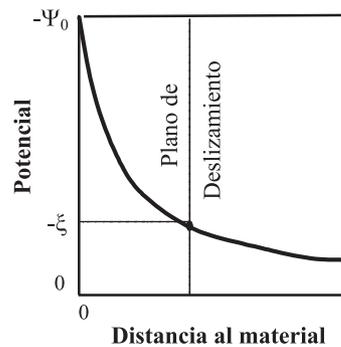
Experimentalmente, el potencial electrocinético puede ser evaluado mediante la técnica de potencial de corriente (Sawyer y Srinivasan, 1972; Thubrikar *et al.*, 1980). Para un flujo laminar, la diferencia de potencial  $\Delta V$  (V) registrada por un par de electrodos ubicados en dos puntos distantes de la solución, es proporcional al gradiente de presión  $\Delta P$  (Pa) entre dichos puntos, y al potencial zeta  $\xi$  (V) establecido en la interfase endotelio – solución electrolítica. El valor obtenido se conoce como potencial de corriente (streaming potential) y está definido por la siguiente expresión:

$$\Delta V = \frac{\xi \Delta P}{4\pi \eta k} \quad (3)$$

donde  $k$  y  $\eta$ : conductancia específica (S) y viscosidad (Pa s), respectivamente. A partir de esta ecuación puede luego valorarse la densidad de carga superficial promedio del endotelio vascular, según la ecuación 1.

### Materiales

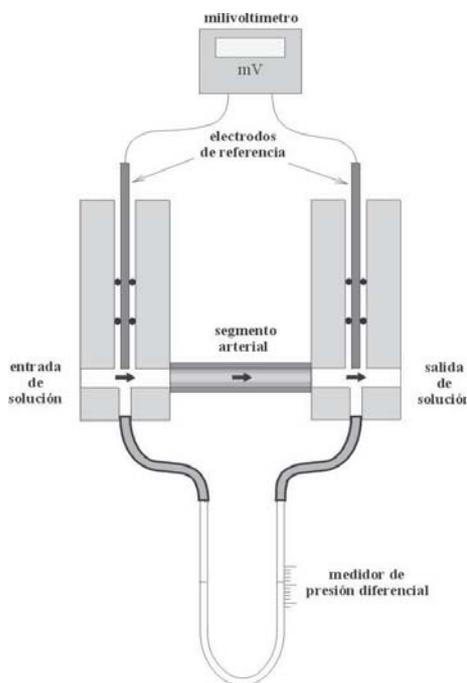
Para determinar *in vitro* las propiedades electrocinéticas del endotelio aórtico, se diseñó una celda de experimentación de resina acetálica y sección cilíndrica, de acuerdo con el procedimiento propuesto por Minassian *et al.* (1998). Los electrodos de registro del potencial de corriente (electrodos de referencia de Ag/AgCl, Cole-Parmer, con un área aproximada de  $175 \times 10^{-6} \text{ m}^2$ ) se insertaron en sendas cavidades ubicadas en ambos extremos de la celda de flujo (a una distancia



**Figura 2.** Potencial en función de la distancia a la macromolécula ionizada, desde su valor  $-\Psi_0$  en la superficie, hasta  $-\xi$  en el plano de corte de la solución. **Figure 2.** Potential in function of distance to ionized macromolecule, from its value  $-\Psi_0$  in the surface, to  $-\xi$  in the slipping plane of the solution.

del orden de 6 diámetros de los segmentos arteriales), y en contacto con la solución electrolítica, la que fue suministrada a través de un reservorio conectado a un dispositivo regulador del caudal de salida. Mediante un multímetro digital de alta impedancia de entrada (Yu Fung, resolución  $100 \times 10^{-6} \text{ V}$ ), se midió el potencial de corriente  $\Delta V$  sobre la superficie endotelial, mientras que el registro de la diferencia de presión que determina el flujo ( $\Delta P$ ), se realizó a través de un manómetro diferencial diseñado específicamente para el rango de presiones de trabajo. Además, a fin de evitar el corrimiento térmico de los potenciales medidos, se sumergió la celda en un baño termostatzado a  $310^\circ\text{K}$ . En la Figura 3 se observa un esquema del sistema de medición.

Para evaluar la relación  $\Delta V$  – concentración electrolítica del medio de perfusión, se emplearon 6 segmentos aórticos del orden de 0.15 m de largo y con un área aproximada de  $78 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ . Estos fueron cuidadosamente removidos de porcinos adultos saludables (peso medio, 250 kilogramos) y lavados con solución salina fisiológica  $0.15 \text{ mol/dm}^3$  de NaCl (pH 7.4), a fin de remover los restos de sangre con un preparado de concentración iónica equivalente a la del plasma, conservándolos posteriormente en solución limpia del mismo tipo, hasta el momento de su uso (dentro de las 4 horas siguientes al sacrificio). Igual procedimiento se repitió en día diferente con otras 4 arterias destinadas al registro del potencial de corriente en función del pH de la solución.



**Figura 3.** Sistema experimental de medición de potencial de corriente sobre el endotelio vascular.

**Figure 3.** Measurement experimental system of streaming potential on vascular endothelium.

### Métodos

Se efectuaron dos series de mediciones utilizando como fluido de perfusión base, solución Ringer apirogénica marca Roux Ocea (0.15 mol/dm<sup>3</sup> NaCl, 0.005 mol/dm<sup>3</sup> CaCl, 0.005 mol/dm<sup>3</sup> KCl, pH corregido a 7.4). La ausencia de agentes pirogénicos en este compuesto iónico evita además, la contaminación de los segmentos arteriales manipulados. En la primera etapa se midió sobre 4 aortas porcinas, el potencial de corriente generado por el flujo de cada una de las soluciones de concentración electrolítica comprendida entre 0.015 y 0.215 mol/dm<sup>3</sup> de NaCl. Las distintas soluciones se obtuvieron adicionando gradualmente a la solución base Ringer NaCl pro-análisis, estimando su equivalente gramo en balanza analítica marca Mettler, resolución de 10<sup>-4</sup> g. Todas las mediciones se realizaron una vez alcanzado el régimen estacionario del sistema, registrando simultáneamente  $\Delta V$  y  $\Delta P$  (en un rango entre 1333 y 6665 Pa). Se obtuvo además el valor de conductividad correspondiente a cada solución, mientras que su viscosidad fue estimada a partir de datos tomados de la literatura (Thubrikar *et al.*, 1980). Así también, se estableció la relación  $\Delta V - \Delta P$  en solución 0.15 mol/

dm<sup>3</sup> de NaCl, para las 2 arterias incubadas durante 1 hora en solución salina conteniendo 20 ml de neuraminidasa marca Boehringer Mannheim a una concentración de 0.05 U/ml, de acuerdo con el procedimiento de Born y Palinski (1985).

En una segunda etapa experimental, se repitió el procedimiento anterior en función ahora del pH del fluido, empleando otros 4 segmentos arteriales. Se midió además su conductividad para cada valor de pH establecido. Cabe agregar aquí que teniendo en cuenta que las variaciones de pH de la solución base causadas por la adición en pequeñas cantidades de disoluciones 0.1 mol/dm<sup>3</sup> HCl y 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH, sólo modifican en alrededor de un 10% su contenido iónico, no se comete un error apreciable al considerar que el espesor de la atmósfera iónica permanece constante en el rango de pH utilizado.

### Resultados

En todos los segmentos arteriales perfundidos con soluciones de diferente concentración electrolítica y pH, se observaron incrementos lineales del valor de potencial de corriente con la presión diferencial, para  $\Delta P$  comprendidas entre 1333 y 6665 Pa. A mayores presiones, esta relación se aparta de la linealidad y por consiguiente los DV medidos no proporcionan una estimación fidedigna de la densidad de carga sobre el endotelio aórtico. Asimismo sobre el rango lineal de  $\Delta V$ , la presión diferencial resulta también proporcional al flujo, estableciéndose un régimen laminar a través del canal.

En la Tabla 1 se indican los potenciales de corriente medidos para un gradiente de presión de 5332 Pa. Así también, en la Figura 4 están representados los resultados de la influencia que ejerce la intensidad iónica del medio de perfusión, sobre los valores promedios del potencial zeta ( $\xi$ ) y la densidad de carga endotelial ( $\sigma$ ) y del espesor de la capa de contraiones adyacente a sus grupos aniónicos superficiales ( $1/\kappa$ ), estimados a partir de las expresiones 3, 1 y 2, respectivamente. Por su parte, en la Tabla 2 se comparan a la concentración electrolítica fisiológica, el valor medio de  $\xi$  y  $\sigma$  correspondiente al endotelio aórtico normal e incubado en neuraminidasa para soluciones 0.015 mol/dm<sup>3</sup> NaCl a pH = 7.4.

En la Tabla 3 puede visualizarse la relación entre  $\Delta V$  y el pH de la solución electrolítica, para un rango de presión diferencial entre 1333 y 6665 Pa. Asimismo, en la figura 5 se representa la relación entre el potencial zeta y densidad de carga media sobre la superficie endotelial considerada y el pH de la solución.

**Tabla 1.** Valor medio de  $\Delta V$  sobre segmentos aórticos porcinos, sometidos al flujo de soluciones de contenido iónico creciente, correspondiente a arterias normales y tratadas con sialidasa. **Table 1.** Average values of streaming potential on porcine aortic segments, submitted to increasing ionic content solutions flow, corresponding to normal and sialidase treated arteries.

Número de arterias	Tipo de arteria	C. electrolítica (mol/dm <sup>3</sup> )	$\Delta V$ (x 10 <sup>-3</sup> V)
4	Normal	0.015	-10.7 ± 0.4
"	"	0.025	-9.8 ± 0.7
"	"	0.035	-8.3 ± 0.5
"	"	0.045	-7.6 ± 0.5
"	"	0.055	-6.3 ± 0.7
"	"	0.065	-5.7 ± 0.8
"	"	0.115	-4.0 ± 0.6
"	"	0.165	-2.8 ± 0.4
"	"	0.215	-1.3 ± 0.6
2	tratada c/ neuraminidasa	0.015	-3.5 ± 0.4

**Tabla 2.** Valores medios estimados de  $\xi$  y  $\sigma$  para arterias normales y tratadas con sialidasa\*. **Table 2.** Estimated values of average charge density and zeta potential, for normal and neuraminidase\* treated arteries.

Número de arterias	C. electrolítica (mol/dm <sup>3</sup> )	$\xi$ (x 10 <sup>-3</sup> V)	$\sigma$ (x10 <sup>-3</sup> C/m <sup>2</sup> )
4	0.015	-55.569	43.79
2*	0.015	-18.177	1.432

## Discusión y Conclusiones

En base a nuestras observaciones experimentales podemos decir en general, que la técnica de potencial de corriente proporciona un método simple para cuantificar la interacción eléctrica dinámica que tiene lugar entre la superficie endotelial y los electrólitos plasmáticos. A través de ella puede evaluarse la contribución a la densidad de carga superficial total promedio del endotelio vascular, de los distintos tipos de moléculas polianiónicas existentes en su matriz extracelular.

La polaridad de los potenciales de corriente medidos (Tablas 1 y 3), indica que la interfase endotelio aórtico – solución electrolítica es negativa respecto de la corriente de fluido, lo cual señala además que el potencial en la superficie de la aorta *in vivo*, tiene igual polaridad. Esto sugiere que los cationes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> y H<sup>+</sup> de la solución de electrólitos en el primer caso y del plasma sanguíneo en el segundo, son atraídos electrostáticamente por los grupos aniónicos del glicocáliz endotelial, determinando la porción difusa de contraiones de la doble capa electroquímica, adyacente a la membrana endotelial. Los iones Cl<sup>-</sup> y OH<sup>-</sup> por su parte (y otros iones negativos en el caso de la sangre) son arrastrados por el flujo y por lo tanto,

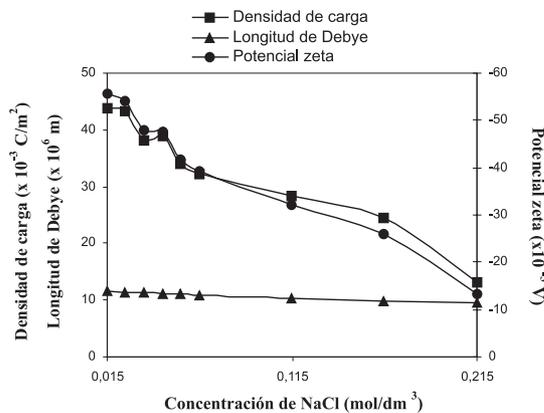
constituyen los principales portadores de carga eléctrica del medio de perfusión.

Por otro lado, si se tiene en cuenta los resultados presentados en la Tabla 2 respecto de la densidad de carga otorgada por los terminales aniónicos de las moléculas de AS sobre la superficie de la aorta porcina, se deduce que las moléculas liberadas durante 1 hora de incubación en solución de neuraminidasa aportan alrededor del 97 ± 0.5 % del total de la carga superficial del endotelio, indicando así que la contribución de los grupos sulfato contenidos en los GSG de su glicocáliz es sólo del 3 ± 0.5 %. De esta manera, nuestros resultados corroboran el análisis efectuado por Holum (1971) y Haldenby *et al.* (1994). Por consiguiente, al igual que estos investigadores, podemos conjeturar en base a nuestras observaciones macroscópicas de este fenómeno eminentemente microscópico que, los terminales carboxil son los principales determinantes de la carga superficial negativa del endotelio vascular, si bien los grupos sulfato también están presentes en pequeñas cantidades.

Analizaremos ahora individualmente los resultados obtenidos en nuestro trabajo experimental respecto de la influencia de los cambios de concentración electrolítica y del pH de la solución, ejercida sobre las

**Tabla 3.**  $\Delta V$  vs. pH de la solución para 4 segmentos porcinos. **Table 3.** Effect of pH on  $\Delta V$  value for 4 porcine segments

Número de arterias	pH de la solución	$\Delta V$ ( $\times 10^{-3}$ V)
4	5.8	$-9.6 \pm 0.8$
"	6.0	$-9.7 \pm 0.9$
"	6.2	$-9.9 \pm 0.7$
"	6.4	$-10 \pm 0.6$
"	6.6	$-10.2 \pm 0.8$
"	6.8	$-10.5 \pm 0.5$
"	7.0	$-10.8 \pm 0.7$
"	7.2	$-11.1 \pm 0.6$
"	<b>7.4</b>	<b><math>-11.2 \pm 0.9</math></b>
"	7.6	$-11.5 \pm 0.8$
"	7.8	$-11.8 \pm 0.5$
"	8.0	$-12.0 \pm 0.7$



**Figura 4.** Dependencia del valor medio de  $\xi$ ,  $\sigma$  y  $r$  respecto del contenido iónico, para 4 segmentos aórticos porcinos. **Figure 4.** Ionic content dependence of average value of  $\xi$ ,  $\sigma$  and  $r$ , for four porcine aortic segments.

propiedades de carga de la interfase objeto de nuestro estudio.

Respecto de la intensidad iónica de la solución y tal como se indica en la tabla a, a medida que aumenta la concentración electrolítica de la solución, se observó una disminución progresiva del valor absoluto de  $\Delta V$  (de hasta un orden de magnitud). Así también, se obtuvo una correlación negativa entre el contenido iónico de la solución y las estimaciones del potencial zeta (valor absoluto) y densidad de carga endotelial, así como del espesor de la capa de contraiones adyacente a sus grupos aniónicos superficiales (Figura 4). Esta correlación negativa entre la concentración

electrolítica del medio de perfusión y el potencial zeta, quizás encuentre su explicación a partir de las inferencias de Glasstone (1942) y otros investigadores (Jirgensons, 1958; Forker, 1971; Goldsmith y Karino, 1987; Atkins, 1991; Mestel *et al.*, 1998; Sader y Chan, 1999), acerca de las características fisicoquímicas de las soluciones coloidales. Trasladando los conceptos desarrollados por ellos al estudio de las propiedades eléctricas de la interfase pared arterial – fluido sanguíneo, podríamos decir que la disminución del potencial zeta provocada por los incrementos de la intensidad iónica de la solución, puede reflejar cambios ya sea en la densidad de carga superficial del recubrimiento endotelial, o bien un ocultamiento de ésta, por efecto de una atmósfera más densa de contraiones alrededor de algunos de sus grupos aniónicos, lo cual disminuye el espesor de la doble capa electroquímica adyacente a éstos.

Si bien y hasta donde hemos podido investigar, no existen evidencias médicas directas que corroboren nuestra hipótesis de que la estructura de carga de los elementos parietales y sanguíneos referidos en este estudio, podría ser modificada por variaciones en la concentración electrolítica del plasma, teniendo en cuenta los conceptos mencionados, cabe imaginar entonces que, entre los innumerables factores que determinan el inicio del desarrollo aterogénico, uno de ellos podría estar asociado con un aumento de la concentración de electrólitos plasmáticos. Ante esto, el endotelio respondería localmente reteniendo en su superficie parte de estos iones. A su vez, esto podría neutralizar algunos grupos aniónicos presentes en ese sitio específico de la íntima arterial, provocando una distribución de cargas eléctricas superficiales diferente y una menor densidad de carga local. Además, dicho fenómeno dejaría expuesta a esta porción de la superficie vascular, a una mayor interacción con los macroiones negativos presentes en sus cercanías, favoreciendo quizás el acercamiento y la adhesión entre ambas superficies. Tal caso podría suceder con los monocitos o las partículas de LDL contenidas en el plasma sanguíneo, dos macromoléculas aniónicas típicamente implicadas en los procesos aterogénicos.

Cabe agregar aquí en el marco de nuestras suposiciones que, al igual que en el caso de las células endoteliales, sería factible también que los iones de la solución afecten la densidad y distribución de carga superficial o el encubrimiento electrostático de estas partículas sanguíneas, “descargando” así sus superficies, además de la endotelial. Particularmente respecto de las partículas de LDL, si bien dichas suposiciones

se contradicen con las conclusiones de Hoff y Gaubatz (1982) y otros investigadores (Chappey *et al.*, 1998), acerca de que las formas oxidadas de las LDL están asociadas con un aumento de la densidad de carga negativa respecto de las LDL nativas, es de destacar los resultados de Frank y Grodinsky (1987), en cuanto a la relación inversa entre la concentración de NaCl de la solución y el potencial electrocinético exhibido por segmentos de cartílago bovino.

De esta manera, nuestros resultados podrían encontrar su explicación en las observaciones de Levine (1998), efectuadas desde el punto de vista del comportamiento fisicoquímico de las macromoléculas en solución electrolítica. Por lo tanto, al igual que este autor, podemos expresar que: *mientras mayor sea la intensidad iónica de la solución electrolítica, más efectivo resultará el encubrimiento electrostático de las macromoléculas individuales, y el potencial zeta correspondiente a cada una de ellas, caerá a su valor en el seno de la solución en un margen más corto de distancia, favoreciendo así su acercamiento.*

Por otro lado, en referencia al efecto del pH de la solución y tal como puede visualizarse en la tabla c, se observa una correlación positiva entre el pH de la solución de electrolitos y el valor absoluto de  $\Delta V$ . Estos resultados concuerdan con lo expresado anteriormente, acerca de la naturaleza diferente de los grupos aniónicos determinantes de carga sobre el endotelio vascular, a distintos valores de pH. Por su parte, la variación paralela encontrada entre el pH de la solución y el potencial zeta y densidad de carga negativa sobre el endotelio aórtico (Figura 5), muestra que el estado de acidez o alcalinidad de esta última, podría afectar ya sea el grado de adsorción parietal de los electrolitos presentes en ella o bien, el nivel de ionización de los grupos carboxil y sulfato contenidos en las moléculas de AS y GSG del glicocáliz endotelial. Desde el punto de vista biomédico, tal suposición es confirmada por las conclusiones de Sawyer *et al.* (1960, 1967), acerca del efecto significativo que tiene el pH del electrolito que baña el vaso sobre la carga superficial del mismo y por las correspondientes a los estudios efectuados por Barlett y Stanley (1998) y Tertov *et al.* (1993; 1997; 1998), quienes han señalado la influencia que tiene el valor de pH plasmático sobre la desialilación de las LDL, una de las primeras modificaciones aterogénicas que sufren estas partículas en el sistema *in vivo*. Otros estudios demuestran la influencia significativa que tiene la pérdida de AS de los glóbulos rojos sobre la agregación eritrocitaria y el desarrollo de complicaciones aterotrombogénicas (Haden *et al.* (1996; 1998)).

Considerando además desde la óptica de la química coloidal lo expresado por Jirgensons y Straumanis (1965), acerca de que las macromoléculas que exhiben normalmente carga negativa, son descargadas con facilidad por los ácidos y recargadas en medios alcalinos, podemos inferir entonces que, las disminuciones del pH del plasma podrían ser las causantes de la menor densidad de carga negativa y en consecuencia, de la disminución del potencial zeta de los tipos celulares que contienen ácido siálico. Así también, si se tiene en cuenta que las macromoléculas biológicas contienen diferentes tipos de moléculas ionizables a distintos valores de pH, es lógico suponer que para cada valor de pH, el grado de ionización de cada una de ellas, podría determinar una densidad de carga superficial diferente sobre el endotelio aórtico. Esta suposición está de acuerdo además con las características electrocinéticas observadas por Frank y Grodinsky (1987) sobre cartílago articular bovino. Por consiguiente, podemos decir que: *la disminución del pH de la solución podría modificar la proporción de ácido siálico, principales moléculas polianiónicas contenidas en la superficie endotelial, y en la correspondiente a los monocitos y partículas de LDL. Esta variación de pH estimularía la actividad de diversas enzimas desialilantes, liberando dichas moléculas y determinando una menor densidad de carga superficial, tanto en el glicocáliz endotelial, como en el de estas células sanguíneas.*

Como conclusión de nuestro trabajo podemos decir que las evidencias encontradas a lo largo de este estudio, indican que los fenómenos electroquímicos que ocurren en estados ateroescleróticos podrían ser el resultado de las variaciones de densidad y distribución local de la carga superficial que exhiben los componentes parietales y sanguíneos involucrados, provocadas por cambios de pH o de la concentración electrolítica del plasma. No obstante, la extrapolación de nuestros resultados al sistema *in vivo* requiere futuras investigaciones, tendientes a dilucidar el probable rol que cumplen en estados aterogénicos, las variaciones en el contenido iónico y pH plasmáticos.

### Agradecimientos

La realización del trabajo experimental no hubiera sido posible, sin la colaboración del Sr. Rubén Santi, Dr. Ricardo Quintero, Ing. Basilio Solorza y Msc. Patricia Varela.

### Referencias

Atkins P.W., (1991), "Estructuras y propiedades de las macromoléculas: coloides", In: *Fisicoquímica*,

- Dalaware: Addison - Wesley Iberoamericana S.A., p. 739-741.
- Barlett A.L., Stanley K.K., (1998), "All low density lipoprotein particles are partially desialylated in plasma", *Atherosclerosis*, v.138, p. 237-245.
- Born G.V.R., Palinski W., (1985), "Unusually high concentrations of sialic acid on the surface of vascular endothelia", *British Journal of Experimental Pathology*, v. 66, n.5, p.543-549.
- Chappey B., Beyssen B., Foos E., Ledru F., Guermonprez J.L., Gaux J.C., Myara I., (1998), "Sialic acid content of LDL in coronary artery disease: no evidence of desialylation in subjects with coronary stenosis and increased levels in subjects with extensive atherosclerosis and acute myocardial infarction. Relation between desialylation and in vitro peroxidation", *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v.18, p. 876-883.
- Danon D., Goldstein L., Marikovsky Y., Skutelsky E., (1972), "Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surfaces". *Journal of Ultrastructure Research*, v. 38, p. 500-510.
- Davies J.T., Rideal E.K., (1963), "Electrokinetic Phenomena", In: *Interfacial Phenomena*, New York: Academic Press, p. 108-124.
- Eylar E.H., Madoff M.A., Brody O.V., Oncley J.L., (1962), "The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte", *Journal of Biological Chemistry*, v. 237, p. 1992-2000.
- Forker W., (1971), "La doble capa electroquímica", In: *Cinética Electroquímica*, Buenos Aires: Universitaria de Buenos Aires, p. 1-18.
- Frank E.H., Grodzinsky A.J., (1987), "Cartilage electromechanics - I. Electrokinetic transduction and the effects of electrolyte pH and ionic strength", *Journal of Biomechanics*, v.20, n.6, p. 615-627.
- Gimbrone M.A. Jr., (1980), "Endothelial dysfunction and the pathogenesis of atherosclerosis", In: *Atherosclerosis—V: Proceedings of the Fifth International Symposium on Atherosclerosis*, Eds.: A.M. Gotto Jr., L. Smith, B. Allen, New York, NY: Springer-Verlag, p. 415-425.
- Gimbrone M.A. Jr., Topper J.N., (1999), "Endothelial dysfunction, hemodynamic forces and atherosclerosis", *Thrombosis and Haemostasis*, v. 82, n. 2, p. 722-726.
- Giuffrè L., Cordey A.S., Monai N., Tardy Y., Schapira M., Spertini O., 1997, "Monocyte adhesion to activated aortic endothelium: role of L-selectin and heparan sulfate proteoglycans", *The Journal of Cellular Biology*, v. 136, n. 4, p. 945-956.
- Glasstone S., (1942), "The theory of electrolytic conductance", In: *Introduction to Electrochemistry*, New York: Lancaster Press, p. 80-85.
- Goldsmith H.L., Karino T., (1987), "Interactions of human blood cells with vascular endothelium", *Annals New York Academy of Sciences*, v. 516, n. 28, p. 468-483.
- Hadengue A., Razavian S.M., Del-Pino M., Simon A., Levenson J., (1996), "Influence of sialic acid on erythrocyte aggregation in hipercolesterolemia", *Thrombosis and Haemostasis*, v. 76, n. 6, p. 944-949.
- Hadengue A.L., Del-Pino M., Simon A., Levenson J., (1998), "Erythrocyte disaggregation shear stress, sialic acid and cell aging in humans", *Hypertension*, v. 32, n. 2, p. 324-330.
- Haldenby K.A., Chappell D.C., Winlove C.P., Parker K.H., Firth J.A., (1994), "Focal and regional variations in the composition of the glycocalyx of large vessel endothelium", *Journal of Vascular Research*, v. 31, n. 1, p. 2-9.
- Hoff H.F., Gaubatz J.W., (1982), "Isolation of a low density lipoprotein from atherosclerotic vascular tissue of WHHL rabbits", *Atherosclerosis*, v. 42, p. 272-280.
- Holum J.R., (1971), "Carbohidratos" In: *Principios de Físicoquímica, Química Orgánica y Bioquímica*, México D. F.: Limusa -Wiley, p. 481-500.
- Jirgensons B., (1958), "Floculation and gelation phenomena", In: *Organic Colloids*, Amsterdam: Elsevier Publishing Company, p. 223-239.
- Jirgensons B., Straumanis M.E., (1965), "Clasificación de los coloides. Los términos básicos de la química coloidal". In: *Compendio de Química Coloidal*, México D. F.: Compañía Editorial Continental, , p. 31-42.
- Levine I.N., 1998, "Sistemas electroquímicos", In: *Físicoquímica*, Madrid: McGraw-Hill, 4° ed., v. 2, p. 468-477.
- Levine S., Levine M., Sharp K.A., Brooks D.E., (1983), "Theory of the electrokinetic behavior of human erythrocytes", *J. Biophysical Society*, v. 42, p. 127-135.
- Mestel A.J., Mokady A.J., Parker K.H., Winlove C.P., (1998), "Effects of the glycocalyx on the electrophoretic mobility of red cells and on streaming potentials in blood vessels: predictions of a structurally-based model", *Biorheology*, v. 35, n. 6, p. 365-381.
- Minassian A., O'Hare D.O., Parker K.H., Urban J.P.G., Warenjo K., Winlove C.P., (1998), "Measurement of the charge properties of articular cartilage by an electrokinetic method", *Journal of Orthopaedic Research*, v. 16, p. 720-725.
- Orekhov A.N., Tertov V.V., Sobenin I.A., Smirnov V.N., Via D.P., Guevara J.G. Jr., Gotto A.M., Morriset J.D., (1992), "Sialic acid content of human low density lipoproteins affects their interaction with cell receptors and intracellular lipid accumulation", *Journal of Lipid Research*, v. 33, p. 805-817.
- Østerud B., (1997), "A global view of the role of monocytes and platelets in atherogenesis", *Thrombosis Research*, v. 85, n. 1, p. 1-22.
- Sader J.E., Chan D.Y.C., (1999), "Electric double-layer interaction between charged particles near surfaces and in confined geometries", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 218, p. 423-432.
- Sawyer P.N., Levine J., Mazlen R., Valmont I., (1960), "Active ion transport across canine blood vessel wall", *The Journal of General Physiology*, v. 45, p. 181-196.
- Sawyer P.N., Srinivasan S., (1967), "Studies on the biophysics of intravascular thrombosis", *American Journal of Surgery*, v. 114, p. 42-60.
- Sawyer P.N., Srinivasan S., (1972), "The role of electrochemical surface properties in thrombosis at vascular interfaces: cumulative experience of studies in animals and man", *Bulletin of New York Academy of Medicine*, v. 48, n. 2, p. 235-256.
- Schwartz C.J., Fine R., Kelley J.L., Sprague E.A., Jauchem

- J., (1980), "Monocyte recruitment in the normal and atheromatous nonhuman primate aorta", *Circulation*, v. 62, (Suppl III), p. 36-42.
- Schwartz C.J., Sprague E.A., Kelley J.L., Valente A.J., Suenram C.A., (1985a), "Aortic intimal monocyte recruitment in the normo and hypercholesterolemic baboon (*Papio cynocephalus*)", *Virchows Archiv A*, v. 405, n. 2, p. 175-191.
- Schwartz C.J., Valente A.J., Sprague E.A., Kelley J.L., Suenram C.A., Rozek M.M., (1985b), "Atherosclerosis as an inflammatory process: the role of the monocyte-macrophage", *Annals New York Academy of Science*, v. 454, p. 115-120.
- Smith C.A., Wood E.J., (1997), In: *Biología Celular*, Dalaware: Addison-Wesley Iberoamericana, p. 45-58.
- Spaan J.A.E., Dekker S., Constantinescu A.A., Vink H., (1999), "The endothelial cell glycocalyx and capillary hemodynamics, *Proceeding of the European Medical & Biological Engineering Conference EMBEC'99, Journal of the International Federation for Medical & Biological Engineering*, Eds.: P. Rehak, H. Hutten, v. 37, n. I, p.1-4.
- Sprage E.A., Moser M., Edwards E.H., Schwartz C.J., (1988), "Stimulation of receptor-mediated low density lipoprotein endocytosis in neuraminidase-treated cultured bovine aortic endothelial cells", *Journal of Cellular Physiology*, v. 137, n. 2, p. 251-262.
- Stryer L., (1988), "Introduction to biological membranes", In: *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company, p. 284-306.
- Tertov V.V., Kaplun V.V., Sobenin I.A., Orekhov A.N., (1998), "Low density lipoprotein modification occurring in human plasma: possible mechanism of in vivo lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification", *Atherosclerosis*, v. 138, n. 1, p. 183-195.
- Tertov V.V., Orekhov A.N., (1997), Metabolism of native and naturally occurring multiple modified low density lipoprotein in smooth muscle cells of human aortic intima, *Experimental and Molecular Pathology*, v. 64, n. 3, p. 127-145.
- Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A., Morriset J.D., Gotto A.M., Guevara J.G., (1993), "Carbohydrate composition of protein and lipid components in sialic acid-rich and -poor low density lipoproteins from subjects with and without coronary artery disease", *Journal of Lipid Research*, v. 34, p. 365-375.
- Thubrikar M., Recih T., Cadoff I., (1980), "Study of surface charge of the intima and artificial materials in relation to thrombogenicity", *Journal of Biomechanics*, v. 13, p. 663-666.
- Verwey E.J.W., Overbeek J.Th.G., (1948), "Theory of a single double layer", In: *Theory of the stability of lyophobic colloids*, Elsevier Publishing Company, New York, p. 1-21.