

Un sencillo microrespirómetro volumétrico diferencial

(Con 4 figuras)

B. Günther y J. Concha

Los micrométodos gasométricos utilizados en la actualidad se basan en dos principios: a) manométrico y b) volumétrico*.

El respirómetro manométrico de volumen constante de **Warburg** (15) y el respirómetro manométrico diferencial de **Barcroft** (1) pertenecen a la primera categoría.

En el principio "volumétrico" se fundan varios microrespirómetros, en los cuales los gases son mantenidos a temperatura y presión constantes y los cambios de volumen son medidos directamente. La gran mayoría de los microrespirómetros se basan en el "principio de compensación" ideado por **Pettersson** (6). Este autor describió en 1886 un aparato gasométrico para el análisis químico del aire, que posteriormente fue modificado por **Sondén** (12) y utilizado por **Sondén** y **Tigerstedt** (13) para la determinación del metabolismo humano.

Es a **Thunberg** (14) a quien se debe la aplicación del "principio de compensación" en la construcción de microrespirómetros. Estos constan fundamentalmente de dos pequeñas cámaras, unidas entre sí por un tubo capilar. En una de las cámaras, la de respiración, se coloca el material biológico a examinar —en un medio fisiológico adecuado— así como el reactivo destinado a absorber ciertos gases. En la otra cámara, la de compensación, se encuentra sólo el reactivo y el medio fisiológico. El tubo capilar contiene una gota de líquido indicador, cuyo desplazamiento es medido en función del tiempo.

Numerosos autores han descrito microrespirómetros que se basan en el modelo original de **Thunberg** (14), tal como el de **Winterstein** (17), de **Widmark** (16), de **Fenn** (5), de **Gerard** y **Hartline** (6), hasta los recientes aparatos de **Cunningham**, **Kirk** y **col.** (3, 2, 11, 4) y de **Scholander** y **col.** (10).

* Para mayores detalles sobre métodos de microrespirometría en general, consúltese la monografía de J. M. Tobias: *Microrespiration Techniques*. *Physiol. Rev.* 23: 61, 1943.

Las ventajas de los microrespirómetros volumétricos (8), en comparación con los que se basan en el método manométrico antes mencionado, pueden resumirse como sigue:

- 1) La teoría en que se fundan es muy sencilla.
- 2) No es necesario calcular la "constante" de las cámaras de medición, como debe hacerse con los microrespirómetros manométricos.
- 3) Se calibra solamente el dispositivo que sirve para medir los volúmenes. Esta calibración es de fácil ejecución.
- 4) Se pueden usar cámaras de diversos tamaños, sin necesidad de tenerlas que calibrar cada vez.
- 5) Estos microrespirómetros son insensibles a los cambios de presión barométrica, de temperatura y de humedad. Por esta razón la termoregulación que se requiere puede ser menos precisa.
- 6) La presión parcial de oxígeno en las cámaras de respiración se mantiene prácticamente constante; en tanto que la presión parcial del anhídrido carbónico es cercana a cero, siempre que exista una eficiente absorción de este gas (exceso de KOH).

7) La construcción de estos microrespirómetros es en algunos casos sencilla y su costo relativamente bajo.

La sensibilidad de los microrespirómetros que utilizan un capilar como sistema de medida volumétrica puede variar en amplio margen; ella será tanto mayor:

- a) cuanto menor sea el diámetro del capilar de medida.
- b) cuanto menos denso sea el líquido que constituye la gota indicadora.
- c) cuanto más pequeña sea la cámara de respiración.
- d) cuanto mayor sea el volumen de la cámara de compensación.

MATERIAL

El microrespirómetro consta de un tubo capilar de aproximadamente 10 cm. de largo, cuyo lumen puede oscilar entre 0.1 y 1.0 mm. de diámetro; de preferencia hemos utilizado capilares de 0.45 mm. de diámetro. El capilar es fijado entonces a una regla graduada, de manera que la escala milimétrica queda frente al lumen del capilar (Fig. 1a).

En los extremos del capilar se colocan dos tubos de vidrio, de iguales dimensiones y de vidrio de la misma calidad. De este modo se consigue una mayor estabilidad térmica del instrumento. Ambos tubos son ocluidos por tapones de goma; uno de ellos deja pasar una aguja hipodérmica, cerrada en un extremo, que tiene un pequeño orificio lateral y cuya función es la de establecer el contacto con la atmósfera (Fig. 1a).

Con fines especiales hemos construido cámaras de respiración de volumen muy reducido (Fig. 1b) y otras apropiadas para el estudio de tejidos especiales como por ejemplo el nervio aislado (Fig. 1c).

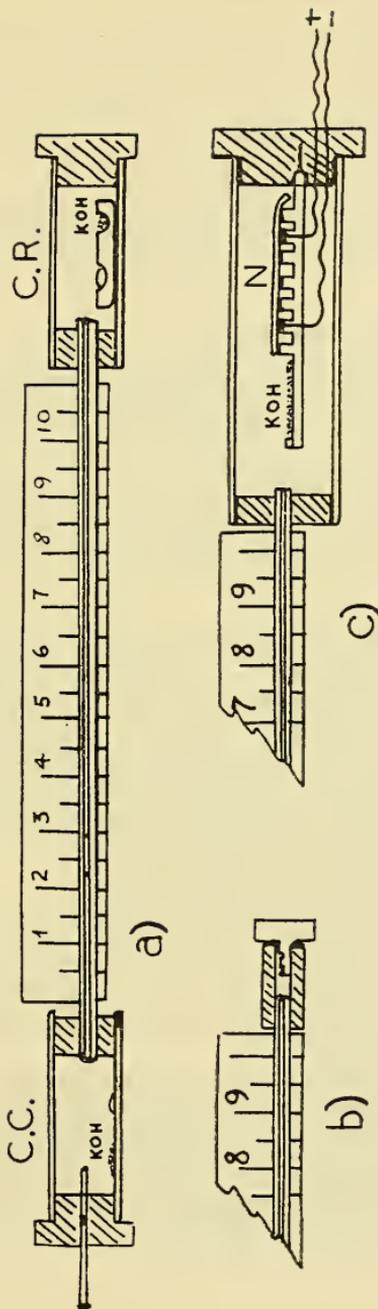


FIGURA 1.

a) Detalles de la construcción del microrespirometro diferencial, que consta de las cámaras de respiración (C. R), de compensación (C. C) y del tubo capilar con su escala milimétrica adjunta.

b) Cámara de respiración de muy pequeña capacidad, que está formada por un tubo de lygon y de un tapón de lúcia, en el cual se encuentran las fosetas para colocar la gota de muestra y la gota del absorbente del CO_2 .

c) Cámara de respiración de un microrespirometro para el estudio del consumo de oxígeno del nervio aislado (N), con sus electrodos de estimulación y el depósito de absorción del anhídrido carbónico (KOH).

CALIBRACION

El tubo capilar, rigurosamente limpio, debe calibrarse con exactitud. Para ello se introduce en su lumen una gota de mercurio; se mide la longitud de la gota en varios sectores del capilar, por medio de un tornillo micrométrico; se pesa el Hg. y se calcula el diámetro del tubo, tomando en cuenta el peso específico del mercurio a la temperatura en que se hizo la determinación.

Algunos autores (7) recomiendan la calibración por medio del desprendimiento de gas de una reacción química cuantitativamente conocida.

METODO DE MEDIDA

Con una pipeta se introduce en el lumen del capilar una gota del líquido indicador. Se recomienda keroseno purificado y destilado según las indicaciones de Kirk (7).

En una de las cámaras, la de respiración, se introduce el material biológico a examinar y un trocito de papel filtro impregnado con una o varias gotas de KOH al 5%. El material biológico, así como el reactivo para la absorción del CO₂, se colocan en pequeñas cubetas de vidrio o de material plástico (lucita), que se confeccionan según las conveniencias de cada caso particular (véase Fig. 1a).

En la cámara de compensación se pone la misma cantidad de KOH al 5% e igual volumen del medio fisiológico que el utilizado en la cámara de respiración. Una vez que ambas cámaras están cargadas, se excluyen éstas de la atmósfera por medio de tapones adecuados, dejando sólo la cámara de compensación en contacto con el aire atmosférico por medio de la aguja hipodérmica especial. A los 15 minutos aproximadamente se introduce más dicha aguja en el tapón, a fin de ocluir totalmente el orificio lateral. En este momento ambas cámaras quedan excluidas de la atmósfera y las variaciones de la presión barométrica no podrán influir en el transcurso del experimento.

Dada la gran sensibilidad de este microrespirómetro a las repentinas variaciones de temperatura, las lecturas de la posición de la gota indicadora deben hacerse a cierta distancia, para lo cual se puede utilizar una lupa. Se evita la influencia de las radiaciones calóricas de la mano o de la cara del observador, encerrando al microrespirómetro en una caja de cobre que tenga una ranura en la tapa para poder hacer las lecturas periódicas en el capilar de medida.

Tomando ciertas precauciones es posible trabajar con este microrespirómetro a cualquier temperatura, siempre que ésta sea uniforme o que ambas cámaras estén expuestas simultáneamente a dichas variaciones. Un calentamiento o enfriamiento asimétrico del microrespirómetro producirá un desplazamiento de la gota indicadora fuera de la escala del capilar, inutilizando por lo tanto al experimento en marcha.

Todos los volúmenes de gases, expresados en microlitros (μl), son reducidos a 0°C , a 760 mm. Hg. y a las condiciones de sequedad (SPTD).

ALGUNAS APLICACIONES

Este microrespirómetro volumétrico tiene las mismas posibilidades de uso que todos los demás instrumentos que se han construido con ese fin. Dado que la sensibilidad del respirómetro depende del diámetro del capilar de medida, ésta se puede variar de acuerdo con la intensidad de la respiración del tejido que se desea estudiar.

Con un respirómetro cuyo capilar tenía sólo 0.1 mm. de diámetro se determinó el consumo de O_2 de un pequeño fragmento de pétalo de geranio (Fig. 2). El control (C), sin el material biológico en la cámara de respiración, dió lecturas constantes durante el transcurso del experimento.

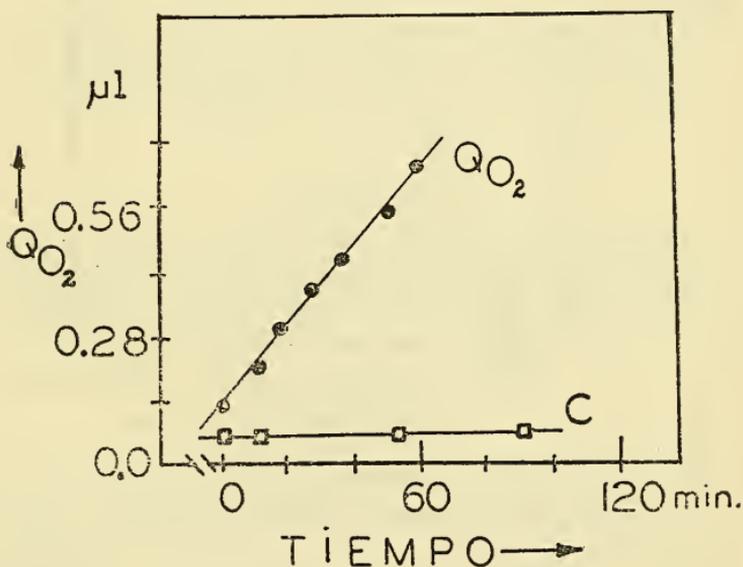


FIGURA 2.

Consumo de oxígeno (QO_2) de un fragmento de pétalo de geranio, en comparación con el control (C).

Ordenados: Consumo de oxígeno en microlitros (μl).

Abscisas: Tiempo en minutos (Min.).

En otro microrespirómetro se colocó un trozo de músculo sartorio de sapo. El consumo de O_2 en reposo se pudo determi-

nar durante varias horas (Fig. 3), utilizando en este caso un tubo capilar de 0.45 mm. de diámetro.

La respiración del nervio ciático de sapo se estudió en reposo y después de la estimulación eléctrica (132 c/s), que se man-

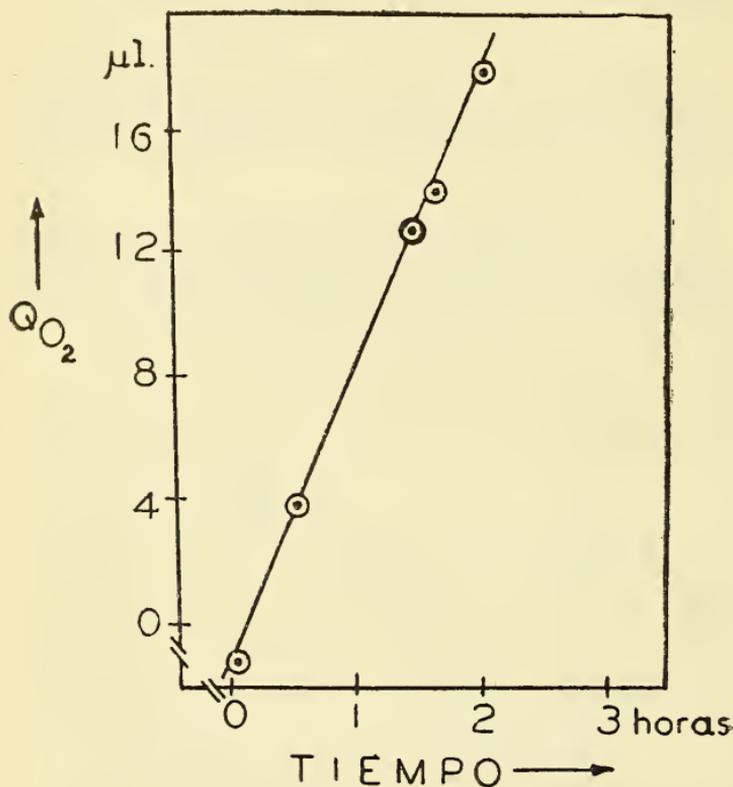


FIGURA 3.

Consumo de oxígeno de un trozo de músculo sartorio de sapo.

tuvo por varias horas. El consumo de oxígeno se intensifica apreciablemente durante el período de estimulación (Fig. 4).

Entre otras posibilidades hemos ensayado con éxito la medición de la respiración: a) en cultivo de gérmenes (bacilo subtilis); b) en suspensiones de células de levadura; c) en pétalos de diversas flores; d) en glóbulos rojos; e) en pequeños insectos.

La simplicidad de su construcción y manejo, su bajo costo, su gran sensibilidad y adecuada estabilidad térmica, permite adaptar el microrespirómetro volumétrico diferencial tanto a los fines de la enseñanza como de la investigación.

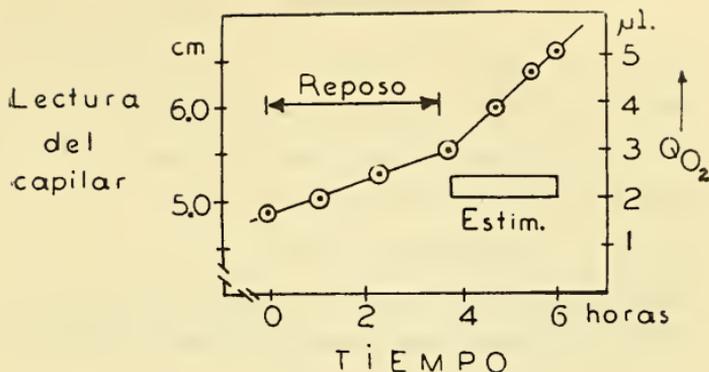


FIGURA 4.

Consumo de oxígeno de un trozo de nervio ciático de sapo, en reposo y durante la estimulación eléctrica con una corriente de 132 estímulos por segundo.

Ordenadas a la izquierda: Lectura directa del desplazamiento de la gota indicadora en el capilar, expresada en centímetros.

Ordenadas a la derecha: Consumo de oxígeno (QO₂) en microlitros (μl).

Abscisas: Tiempo en horas.

RESUMEN

Se describe un microrespirómetro volumétrico diferencial basado en el "principio de compensación" de **Petterson-Thunberg**. La construcción es simple y sólo se utilizan materiales de que se dispone habitualmente en los laboratorios. Son descritas algunas aplicaciones biológicas de este microrespirómetro.

SUMMARY

A volumetric microrespirometer based on the **Petterson-Thunberg** compensation principle is described. The construction is simple and the materials used are available in each laboratory. Various biological applications of the microrespirometer are shown.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein volumetrischer Mikrorespirometer wird beschrieben, der auf dem Kompensationsprinzip von **Petterson-Thunberg** beruht. Die Konstruktion ist einfach und das Material das dazu benutzt wird ist in jedem Laboratorium vorhanden. Einige biologische Anwendungen dieses Mikrorespirometers werden gezeigt.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BARCROFT, J.—*J. Physiol.*, 37: 12, 1908.
 - 2.—BARTH, L. C., KIRK, P. L.—*J. Gen. Physiol.*, 25: 663, 1941/42.
 - 3.—CUNNINGHAM, B., KIRK, P. L.—*J. Gen. Physiol.*, 24: 135, 1940.
 - 4.—ENTNER, N. KIRK, P. L.—*J. Gen. Physiol.*, 34: 431, 1951.
 - 5.—FENN, W. O.—*Amer. J. Physiol.*, 80: 327, 1928.
 - 6.—GERARD, R. W., HARTLINE, K.—*J. Cell. Comp. Physiol.*, 4: 141, 1934.
 - 7.—KIRK, P. L.—*Quantitative Ultramicroanalysis*. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1950. p. 237.
 - 8.—*Manometric Techniques and Tissue Metabolism* (W. W. Umbreit, Edit.) Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1949. p. 97.
 - 9.—PETTERSSON, O.—*Z. anal. Chem.* 25: 467, 1886.
 - 10.—SCHOLANDER, P. F., CLAFF, C. L., ANDREWS, J. R., WALLACH, D. F.—*J. Gen. Physiol.*, 35: 375, 1951.
 - 11.—STERN, H., KIRK, P. L.—*J. Gen. Physiol.*, 31: 239, 1948.
 - 12.—SONDEN, K.—*Z. anal. Chem.*, 26: 592, 1887.
 - 13.—SONDEN, K., TIGERSTEDT, B.—*Skand. Arch. Physiol.*, 6: 1, 1895.
 - 14.—THUNBERG, T.—*Skand. Arch. Physiol.*, 17: 74, 1905.
 - 15.—WARBURG, O.—*Biochem. Z.*, 142: 317, 1923.
 - 16.—WIDMARK, E. M. P.—*Skand. Arch. Physiol.*, 24: 321, 1911.
 - 17.—WINTERSTEIN, H.—*Zbl. f. Physiol.*, 20: 41, 1906.
-