

## APLICACIÓN DE LA ELECTROFISIOLOGÍA COMO HERRAMIENTA TÉCNICA EN ACUICULTURA

por ANDRÉ BÁRANY RUIZ<sup>\*,†</sup>, MARIA GUILLOTO<sup>\*</sup>, JUAN FUENTES<sup>+</sup> Y JUAN MIGUEL MANCERA<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES, CAMPUS DE EXCELENCIA (CEI-MAR), UNIVERSIDAD DE CÁDIZ, 11519 PUERTO REAL, CÁDIZ, ESPAÑA. <sup>†</sup>CENTRE OF MARINE SCIENCES (CCMAR), UNIVERSIDADE DO ALGARVE, CAMPUS DE GAMBELAS, 8005-139 FARO, PORTUGAL

ANDRE.BARANY@UCA.ES

Enviado: 03/09/2019  
Aceptado: 22/10/2019

### ¿Qué es la electrofisiología?

La electrofisiología es un conjunto de técnicas que permiten cuantificar la actividad biológica total de proteínas situadas en las membranas celulares y/o en los espacios entre ellas, en forma de parámetros eléctricos obtenidos en tejidos/epitelios analizados *ex vivo*: epitelio opercular, intestino anterior, intestino posterior, etc.

Para estos análisis *ex vivo*, los tejidos se montan en cámaras de Ussing, se airean bilateralmente con oxígeno (99,5%) y se mantienen a una temperatura constante de 18.5 °C. El potencial transepitelial ( $V_t$ , en mV) se referencia al lado de serosal (sangre) respecto al lumen intestinal, haciéndolo 0. La corriente de cortocircuito ( $I_{sc}$ , en  $\mu A/cm^2$ ) se monitorizada expresando: i) absorción de aniones/ secreción de cationes como valores negativos (de lumen a serosa); y ii) secreción de aniones/absorción de cationes como valores positivos (de serosa a lumen; Figura 1).

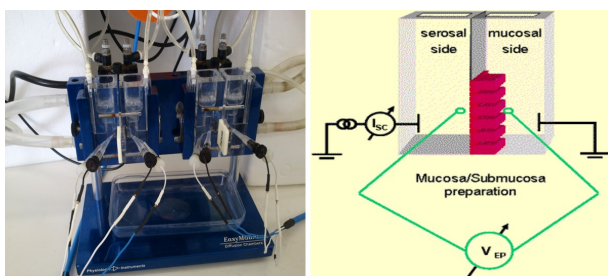


Figura 1. Cámara de Ussing (izq.) y representación esquemática de esta (dcha.).

La resistencia epitelial ( $R_t$ , en  $\Omega cm^2$ ) se calcula de acuerdo con:

$$\text{Ley de Ohm} \rightarrow R = \frac{V}{I}$$

usando las interferencias de corriente inducidas por pulsos de 2 mV de 3 segundos por minuto.

La corriente de cortocircuito y las interferencias se registran por medio de un amplificador epitelial DVC1000 (World Precision Instruments, Sarasota, USA) y se almacenan en un PC usando un sistema de adquisición de datos (LabTrax, World Precision Instruments, Sarasota, USA). Los parámetros bioeléctricos para cada tejido se registran después de lograr la estabilidad de cada uno, lo que sucedía transcurridos 30 o 40 minutos después del montaje de las biopsias en las cámaras.

Los valores de estos parámetros son el resultado de la integración de los movimientos en diferentes sentidos de aniones y cationes a través del tejido o membrana en cuestión. Estos movimientos dependen de proteínas específicas, denominadas transportadores iónicos, que pueden clasificarse en dos grandes grupos: i) transportadores activos, los cuales requieren de una fuente de energía (como el ATP) para el movimiento de cargas contra gradiente, generando así gradientes electrogénicos favorables para el organismo (p. ej. bombas ATPasas); y ii) transportadores pasivos, que al contrario que los anteriores funcionan en un rango de gradientes preestablecidos por las ATPasas. Dentro de este segundo grupo encontramos a) cotransportadores iónicos, los cuales mueven los iones en una misma dirección (p. ej. *nkcc* y/o *ncc*); b) canales iónicos, que son proteínas especializadas en el movimiento de un determinado tipo de ion (p. ej. *cftr* y/o *ENaC*); y c) intercambiadores iónicos que mueven un ion en cada dirección siendo la estequiometría del intercambio dependiente de la proteína e ion en cuestión (p. ej. intercambiador  $Cl^-/HCO_3^-$ ).

A nivel del intestino, este movimiento de iones entre ambos lados del epitelio intestinal también involucra procesos como la absorción de determinados nutrientes como la glucosa<sup>[1]</sup>, aminoácidos específicos<sup>[2]</sup> y algunas vitaminas y minerales<sup>[3]</sup>. Estos movimientos están ligados principalmente al movimiento del catión sodio hacia la sangre. De este modo, se

aprovechan los gradientes iónicos para introducir estas sustancias dentro de los enterocitos o facilitar una absorción paracelular de agua y/o péptidos de mayor peso molecular. La absorción de agua está ligada a la absorción del anión cloro, aunque aún no está claramente establecido la vía que usan mayormente las moléculas de agua para entrar a las células y al tejido, pudiendo ser vías paracelulares<sup>[4]</sup> y/o transcelulares mediadas por acuaporinas<sup>[5]</sup>.

Esta técnica permite por tanto cuantificar y caracterizar el estado bioeléctrico de un tejido en forma de corrientes iónicas absortivas (-) o secretoras (+), y a su vez la resistencia eléctrica puede considerarse reflejo de la apertura de la vía paracelular regulada entre otras por proteínas como las ocludinas y claudinas<sup>[6]</sup>. De esta manera se puede cuantificar las condiciones biológicas del tejido, así como detectar posibles interrupciones provocadas por agentes externos como la presencia de factores antinutricionales en la dieta, tóxicos o cambios en parámetros físico-químicos del agua.

### ¿Qué son las aflatoxinas?

Las aflatoxinas son micotoxinas, metabolitos secundarios producidos por los hongos, concretamente por hongos del género *Aspergillus* y de dos especies *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estos hongos están muy presentes desde climas tropicales a templados si las condiciones de almacenamiento de pienso no son buenas y hay presencia de humedad. Existen de un total de 13 tipos de aflatoxinas, y las más conocidas son la B y la G. Los efectos biológicos producidos como respuesta al consumo de aflatoxinas dependen de la especie, la edad, el sexo, el estado nutricional, los componentes de los alimentos en los que estén presentes y las interacciones con sustancias químicas. Adicionalmente, la dosis y el periodo de exposición del organismo a la toxina también son muy importantes. Su peligrosidad está determinada básicamente por su toxicidad crónica<sup>[7]</sup>.

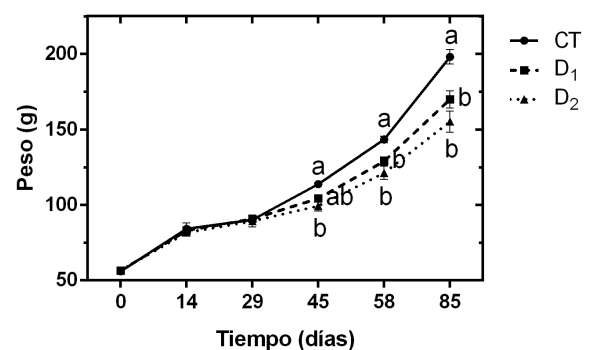
### Efectos negativos de las micotoxinas en la práctica acuícola: un ejemplo práctico

Nuestro grupo de investigación realizó una experiencia para probar el efecto de la aflatoxina B1 (AFB1, SIGMA, A6636) sobre el crecimiento y metabolismo de ejemplares de dorada (*Sparus aurata* L.).

Para ello se prepararon tres piensos: i) pienso control sin aflatoxina (CT); y ii) pienso conteniendo 1 mg AFB1/Kg de pienso AFB1 (D1); y iii) pienso conteniendo 2 mg AFB1/Kg de pienso AFB1 (D2).

De este modo, se establecieron 3 grupos experimentales por triplicado. Se emplearon juveniles de dorada que fueron aclimatados en 9 tanques de 500 L de capacidad, a una densidad de  $4 \pm 0,4$  g/L, con agua de mar (AM, 38‰ salinidad) en circuito abierto, con una temperatura constante (18-19 °C) y un fotoperiodo natural. La alimentación de los peces se realizó diariamente con comederos automáticos y se establecieron 3 tomas (10:00 h, 16:00 h y 21:00 h), ayunando el domingo. Se suministró una dosis del 2% diario de la biomasa total de cada tanque. El experimento duró un total de 85 días: desde el 24/04/2017 al 17/07/2017.

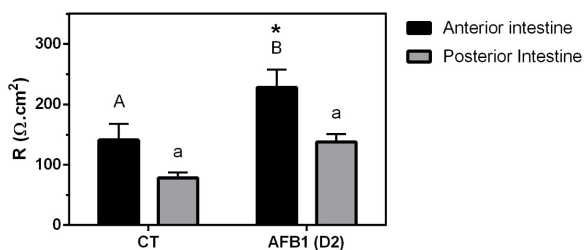
En el peso se apreció una relación lineal inversa entre crecimiento y dosis de aflatoxina, reduciéndose la tasa de crecimiento en biomasa (peso) a la mitad para el grupo de mayor concentración AFB1 respecto al grupo CT (Figura 2).



**Figura 2.** Evolución del peso corporal de doradas alimentadas con diferentes dietas experimentales (CT, D1 and D2) durante 85 días. Los datos son presentados como media  $\pm$  E.S.M. (n = 90). Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos para el mismo tiempo dado (ANOVA 2 Factores, P <0.05, completado con un test de Tukey).

En cuanto a los parámetros bioeléctricos analizados sólo se tomaron para grupos CT y D2, apreciándose que la resistencia eléctrica (R) aumenta significativamente para el caso del grupo D2 en el intestino anterior. También se aprecia como en el grupo CT no existen diferencias significativas entre intestino anterior y posterior en función de la resistividad eléctrica, pero ésta si aparece para el grupo D2 (Figura 3A). En relación a los valores de corriente eléctrica (Isc) se observa que el grupo CT muestra diferencias significativas entre intestino anterior y posterior, siendo los tejidos preferentemente absortivos. Para el grupo D2 estas diferencias desaparecen y se reducen los valores negativos, indicando mayores procesos de secreción o bien menos absortividad del tejido (Figura 3B).

Nuestros resultados indican que la Aflatoxina B1 afecta negativamente al crecimiento de los peces, reduciendo el mismo. Además, esta sustancia repercute directamente en la fisiología intestinal caracterizada a través de las propiedades bioeléctricas del tejido de dos maneras: i) aumenta significativamente la resistividad eléctrica ( $R_t$ ) en intestino anterior, lo que puede inducir una mayor oclusión de los espacios paracelulares, minimizando así el transporte de iones, agua y/o péptidos; y ii) reduce significativamente las corrientes de absorción iónicas en intestino posterior, lo que podría afectar negativamente a la absorción de aminoácidos, glucosa libre y otros nutrientes esenciales por parte de los transportadores dependientes del sodio.



**Figura 3.** Resistencia del tejido ( $R_t$ ,  $\Omega.cm^2$ ) (A) y corriente de cortocircuito ( $I_{sc}$ ,  $\mu A/cm^2$ ) (B) en intestino anterior y posterior de doradas alimentadas durante 85 días con CT y AFB1 (D2). Cada columna se representa media  $\pm$  E.S.M. (n=13-14). Para mismas regiones intestinales diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos experimentales (mayúsculas: intestino anterior, minúsculas: intestino posterior), asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre regiones intestinales para el mismo tratamiento (ANOVA 2 Factores,  $P < 0.05$ , completado con un test de Bonferroni).

En resumen, la electrofisiología es una herramienta con potencial de aplicación en la productividad acuícola y con resultados a tiempo real pudiendo integrar parámetros bioeléctricos y biométricos para cuantificar el estado de los epitelios, efecto de piosos con formulación específica y en perspectiva para obtener una mayor garantía sobre el estado intestinal de la especie cultivada.

## Referencias

- [1] Wood I. S., y Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, 89 (1): 3-9, 2003.
- [2] McGivan J. D., and Pastor-Anglada M. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochemical Journal*, 299 (Pt 2): 321-334, 2015.
- [3] Kiela P.R., y Ghishan F.K. Physiology of intestinal absorption and secretion. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 30(2), 145-159, 2016.
- [4] Wood C. M., y Grosell M., Independence of net water flux from paracellular permeability in the intestine of *Fundulus heteroclitus*, a euryhaline teleost. *Journal of Experimental Biology*, 215: 508-517, 2012.
- [5] Preston G. M., y otros. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256 (5055): 385-7, 1992.
- [6] Furuse M., y otros. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of Cell Biology* 156 (6): 1099-1111, 2002.
- [7] Cepeda S. A., y otros. Aflatoxicosis in chinchillas (*Chinchilla lanigera*). *MVZ Córdoba* vol. 16: 1, 2011.