

CAMBIOS FUNCIONALES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATAS HIPERTENSAS PORTALES PREHEPATICAS

¹CAMILA SCORTICATI; ¹JUAN PABLO PRESTIFILIPPO; ²GUSTAVO MURER; ¹ABRAHAM LEMBERG; ¹JUAN CARLOS PERAZZO

¹Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica; ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen La hipertensión portal prehepática experimental produce alteraciones morfológicas en la barrera hematoencefálica (BHE), astrogliosis y angiogénesis en áreas CA4 y CA1 del hipocampo. El objetivo fue estudiar los posibles cambios funcionales de la BHE en ratas HP. Métodos: Se usaron ratas Wistar Kyoto macho de 240g las que se dividieron en: GI (n=8) hipertensas portales por estrechez reglada de la vena porta; GII (n=6) con operación simulada (sham). Se determinaron la integridad funcional de la BHE por Trypan Blue (TB, Reynolds), concentración proteica (CP) en líquido cefalorraquídeo (LCR, Bradford), actividad eléctrica cortical (EEG), contenido de agua en cerebro (gravidimetría) y test conductuales: Animex, righting reflex, dolor y Rotarod. El TB fue positivo en áreas perivasculares e hipocampo solo en el GI; la CP en LCR (ug/ml) fue (X±ESM); GI: 40.6±6.8 y GII: 16.5±4.2 (p<0.005) y en plasma (mg/ml): GI: 108.8±7.6 y GII: 87.4±2 (NS). El EEG se mostró alterado con predominancia de onda delta para GI: 0.551±0.033 y GII: 0.342±0.031 (p<0.008), el porcentaje de agua por g/tejido cerebral fue GI: 79.21±0.2, GII: 78.95±0.18 (NS). Estos resultados demuestran la existencia de cambios funcionales en la BHE con una presentación subclínica de encefalopatía hepática en ratas con HP.

Palabras clave: barrera hemato-encefálica, hipertensión portal, encefalopatía hepática subclínica

Abstract *Prehepatic Portal Hypertension Produces Functional Alterations in Rat Central Nervous System.*

Prehepatic Portal Hypertension (PH) leads to morphologic changes in the rat Central Nervous System, including alterations of the blood brain barrier (BBB), and astrogliosis and angiogenesis in CA1 and CA4 hippocampal fields. The present study investigates functional changes in portal hypertensive rats. Wistar Kyoto rats were used (240g/bw) and allotted in two groups: GI (n=8) portal hypertensive rats obtained through a regulated stenosis of the portal vein (Groszmann), and GII (n=6), sham-operated rats. We have analyzed: BBB integrity with the Trypan Blue diffusion method (TB, Reynolds), protein concentration (PC) in Cerebrospinal Fluid (CSF) and plasma (Bradford method), electroencephalographic activity (EEG), cerebral edema expressed as brain water content (gravimetric test), and behavior: Animex, righting reflex, pain reflex and Rotarod. TB was positive in GI in peripheral vascular areas in hippocampus, PC in CSF (ug/ml)(X±SED) was GI: 40.6±6.8 and GII: 16.5±4.2 (p<0.005), and the plasma levels were (mg/ml): GI: 108.8±7.6 and GII: 87.4±2 (NS). The EEG showed a higher power of the delta band in hypertensive rats (GI: 0.551±0.033 and GII: 0.342±0.031, p<0.008), but water content was not different between GI and GII (water%/per/g/tissue) (GI: 79.21±0.2, GII: 78.95±0.18). These results, showing functional changes in the BBB and brain activity without behavioral alterations, suggest the development of a subclinic form of hepatic encephalopathy in our model of PH rats.

Key words: Blood Brain Barrier, Portal Hypertension, Subclinic Hepatic, Encephalopathy

La hipertensión portal (HP) es una de las complicaciones más frecuentes de la cirrosis hepática humana, reproducible en modelos experimentales¹. La HP produce alteraciones hemodinámicas tanto en la circulación esplácnica como sistémica. En los últimos años hemos demostrado la existencia de alteraciones en el Sistema

Nervioso Central producidas por la HP prehepática en ratas, de ellas, las más relevantes comprenden el aumento de la liberación y disminución de la recaptación de noradrenalina (NE)^{2,3} en núcleos grises; cambios en la actividad de la tirosina hidroxilasa, y modificaciones morfológicas de la barrera hematoencefálica (astrocitos y células endoteliales) de las áreas CA1 y CA4 del hipocampo (trabajo en prensa).

Con el objeto de evaluar si las modificaciones antes descritas producían cambios en las funciones centrales se determinó la permeabilidad de la barrera

Dirección postal: Camila Scorticati, Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956, 5to piso (1113). Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
Fax: (54-11) 4964-8268. E-mail: cscorti@ffyb.uba.ar

hematoencefálica (BHE), la concentración de proteínas en líquido cefalorraquídeo (LCR) y plasma, el contenido de agua en la corteza cerebral, la actividad eléctrica de la corteza cerebral por electroencefalografía (EEG)⁴, y se efectuaron tests conductuales y evaluaron reflejos posturales.

Material y Métodos

Se utilizaron ratas adultas macho Wistar Kyoto de 240 g de peso promedio, que fueron divididas en dos grupos de 8 y 6 animales respectivamente: 1.- Grupo Hipertensas Portales Prehepáticas por la técnica de Groszmann (HP)⁵; para ello se anestesiaron con éter y luego de una incisión en la línea media abdominal se produjo la estrechez reglada de la vena porta con una aguja de 20-gauge (1.2-mm de diámetro externo), suturando luego la incisión con hilo de seda 3/0; 2.- Grupo Control al que se le practicó una operación simulada (Sham). Los animales fueron alojados en jaulas individuales con libre acceso a agua y comida, y ciclos de luz-oscuridad (12hs-12hs) y temperatura ambiente controladas. A los 14 días de operadas se realizaron las siguientes evaluaciones:

Perfusión transcárdica de Trypan Blue: Los animales fueron anestesiados con etil-uretano (1 mg/kg), perfundidos con 200 ml de una solución de Trypan-Blue (TB) al 0.5% en buffer fosfato salino (PBS) con 25 unidades de heparina y una temperatura de entre 10-12°C, y luego con 300 ml de una solución de paraformaldehído al 2% en PBS a una velocidad de 25 ml/min. Se extrajo el cerebro, conservándose en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% durante dos días a -20°C. Los cortes de 30 mm de espesor efectuados en criostato fueron montados en portas gelatinizados y observados en microscopio óptico convencional. Los resultados fueron evaluados como positivo (+) o negativo (-) para la coloración de TB descartándose aquellos en los cuales hubiere ausencia de coloración en eminencia media y plexos coroideos⁶. La zona evaluada correspondió al hipocampo.

Determinación de Proteínas en LCR: Luego de la anestesia se tomaron muestras de LCR por punción cisternal para la medición de proteínas por el método de Bradford⁷.

Electroencefalograma: Dos electrodos de plata fueron implantados según la técnica descrita por Popken para la medición de la actividad EEG. La señal, obtenida durante períodos de vigilia tranquila fue amplificada, filtrada (1-100 Hz), y digitalizada (1000 Hz, Axon Instr.). Para cada animal, 3 a 5 segmentos de señal de 30 seg de duración, registrados a lo largo de 1 hora, fueron utilizados para obtener espectros de potencia relativa mediante una transformada rápida de Fourier. Para las comparaciones entre grupos se analizaron las siguientes bandas frecuenciales: 0-3.99 Hz (delta); 4-7.99 Hz (theta); 8-11.99 Hz (alfa) y 12-27 Hz (beta) para su posterior comparación⁸.

Contenido de agua en el Cerebro: Se utilizó el método gravimétrico⁹.

Tests conductuales: Animex: test de motilidad espontánea; righting reflex: de enderezamiento; de estimulación dolorosa, y rotarod: coordinación motora.

Estadística: Los resultados fueron expresados como Media \pm ESM y analizados mediante un ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls, con un nivel de significación del 5% (para proteínas y contenido de agua en corteza cerebral), o mediante una ANOVA de dos vías (grupo y banda frecuencial) seguido de un test de Tukey (para el EEG).

Resultados

Los cortes observados al microscopio óptico revelaron un resultado negativo para el grupo Sham y positivo para el grupo HP con marcada difusión de TB en áreas perivasculares del hipocampo. La concentración de proteínas (ug/ml) en LCR fue, en el Grupo Sham de 16.5 ± 4.2 , y en el Grupo HP de 40.6 ± 6.8 ($p < 0.005$). En plasma los valores fueron (mg/ml) 87.4 ± 2 y 108.8 ± 7.6 para el Grupo Control y HP respectivamente (NS). (Fig. 1).

El porcentaje de agua medido por gramo de tejido cortical cerebral no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (78.95 ± 0.18 vs 79.21 ± 0.20 , Sham y HP respectivamente).

Los tests conductuales no ofrecieron diferencias significativas entre los grupos Sham y HP.

Del análisis del EEG se obtuvieron las potencias relativas de las siguientes bandas: delta: 0.342 ± 0.031 , $0.551 \pm 0.032^*$; theta: 0.356 ± 0.019 , 0.279 ± 0.024 ; alfa: 0.120 ± 0.011 , 0.082 ± 0.004 y beta: 0.178 ± 0.025 , 0.088 ± 0.012 para los grupos Sham vs. HP, respectivamente (Tukey * $p = 0.008$, Fig 2).

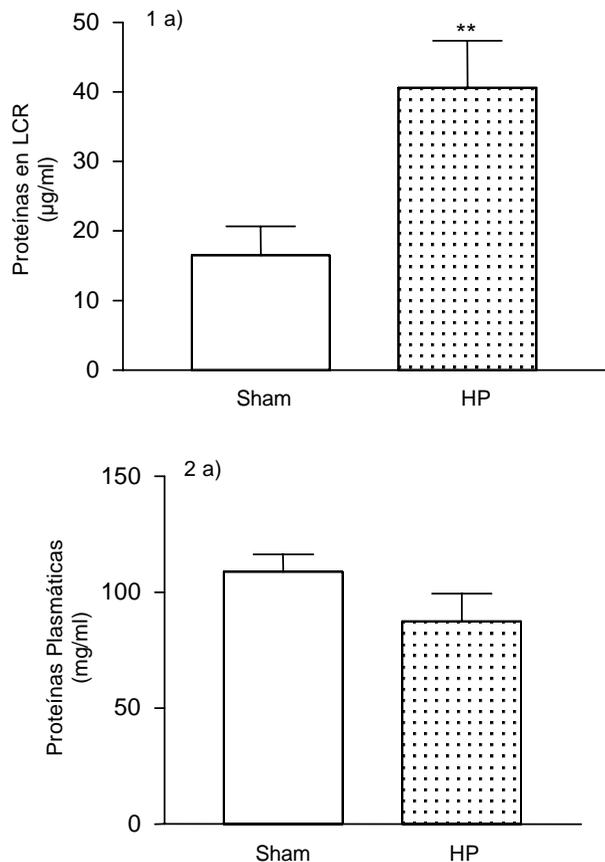


Fig. 1.- Compara la CP de ratas Sham vs HP en: a) LCR expresada como ug de proteínas por ml y b) plasma como mg de proteínas por ml. ** $p < 0.005$ ANOVA-Newman-Keuls.

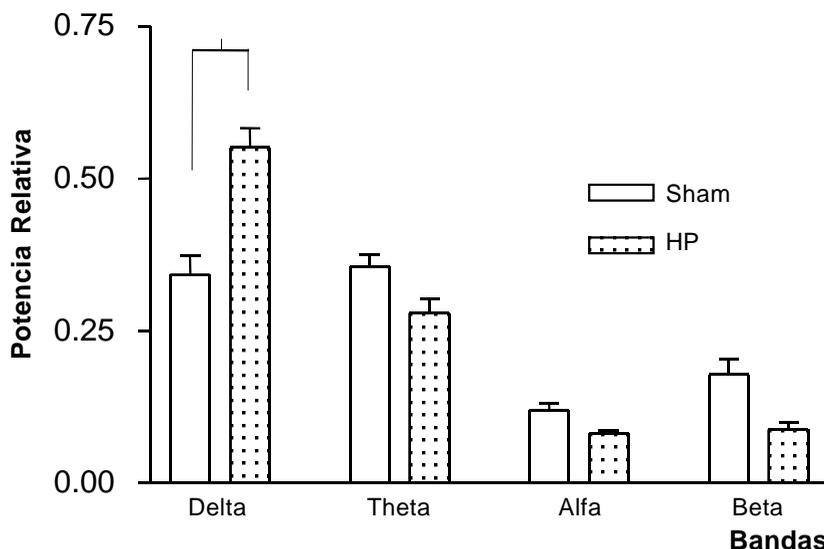


Fig. 2.- Compara la potencia relativa de distintas bandas del EEG entre ambos grupos, mediante un ANOVA de dos factores, tratamiento y bandas, éste último considerado como "medidas repetidas". El ANOVA mostró un efecto significativo del factor bandas ($p < 0.00001$) y de la interacción ($p = 0.00006$). Un análisis post-hoc mediante el test de Tukey demostró que los grupos sólo diferían significativamente en la potencia de la banda delta, que fue mayor en los animales HP. * $p = 0.008$, test de Tukey.

Discusión

Los resultados obtenidos confirman que los cambios morfológicos que observamos en la BHE de ratas con HP (astrogliosis y aumento del número y tamaño de las células endoteliales) se acompañan de una alteración funcional evidenciada por la difusión del TB y por el aumento de la concentración de proteínas en el LCR.

Las modificaciones observadas en el EEG (aumento de la potencia relativa de la banda delta) indica un corrimiento del espectro a frecuencias más bajas en las ratas HP. Este fenómeno es común a otras situaciones en las que se produce depresión del SNC, como la anestesia y diversas encefalopatías metabólicas, y también sigue a diversas lesiones orgánicas del SNC.

Las lesiones producidas en el SNC en nuestro modelo de HP, que no alcanzaron para modificar los tests conductuales, permiten afirmar que obtuvimos una forma subclínica de encefalopatía hepática. Este modelo será de utilidad para estudiar el desarrollo de la misma en su forma temprana^{10, 11}.

Bibliografía

1. Genecin P, Groszman RJ. The Biology of Portal Hypertension. *The Liver: Biology and Pathobiology* (Third Edition) Raven Press, Ltd., New York 1994.
2. Lemberg A, Eizayaga FX, Vatta M, et al. Prehepatic portal hypertension in rats modifies norepinephrine metabolism in the hypothalamus, medulla oblongata and portal vein. *Dig. Dis. Sci.* 1993; 38: 1259-62.
3. Lemberg, A, Perazzo, J, Romay S. et al. Norepinephrine Uptake is Enhanced in discrete telencephalic and diencephalic areas and nuclei in prehepatic portal hypertensive rats. *Brain Research Bulletin* 1998; 45(2): 153-6.
4. Vogels, M, Karlsen, O, Mass MA, et al. L ornitina-L - aspartate as treatment for hyperammonemia-induced encephalopathy in rats. *J Hepatol* 1997; 26: 174-82.
5. Chojkier M, Groszmann R J. Measurement of portal systemic shunting in the rat by using gamma label microspheres. *Am. J. Physiol* 1981; 240: G 371-5.
6. Reynolds DS and Morton AJ. Changes in blood-brain barrier permeability following neurotoxic lesions of rat brain can be visualised with trypan blue. *J Neurosc Meth* 1998; 79: 115-21.
7. Reiber, H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) a concept common to normal blood-CSF function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurological Sciences* 1994; 189-203.
8. Popken RJ, Kropveld D, Oosting J, Chamuleau RA. Qualitative analysis of EEGpower density spectra in experimental hepatic encephalopathy. *Neuropsychobiol* 1983; 9: 235-43.
9. Marmarou A, Poll W, Shulman K, Bhagavan H. A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J Neurosurg* 1978; 49: 530-7.
10. Albrecht J, Jones A.: Hepatic Encephalopathy. Molecular mechanism underlying the clinical syndrome. *J. Neurolog. Sciences* 1999; 170: 138-46.
11. Haussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dhal S. Hepatic Encephalopathy in Chronic liver disease: a clinical manifestation of Astrocyte Swelling and low Grade of Cerebral Edema? *J Hepatol* 2000; 32:1035-8.

Ganador Premio «Dr. Esteban Montuori»