

## Hipotensión y difusión de Rb<sup>86</sup> en cerebro de rata\*

C. Font<sup>1</sup>, M. W. B. Bradbury, A. J. Strong<sup>2</sup> y M. E. Plagaro-Cordero

Department of Physiology  
King's College  
Strand WC2R 2LS, London, U.K.

(Recibido el 23 de junio de 1983)

C. FONT, M. W. B. BRADBURY, A. J. STRONG and M. E. PLAGARO-CORDERO.  
*Hypotension and <sup>86</sup>Rb Diffusion in Brain of Rat.* Rev. esp. Fisiol., 41, 171-176. 1985.

Studies on the permeability of potassium at the blood-brain barrier of rats show that, under normal conditions, the concentration of this ion is kept constant although wide variations in plasma are present. <sup>86</sup>Rb has been utilized as an analog of K<sup>+</sup>. The permeability constant for control animals (arterial blood pressure of 100 ± 3 mmHg), has been determined in 0.926 ± 0.02 ml × g<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup> (brain cortex), and 1.107 ± 0.12 ml × g<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup> (cerebellum). The permeability constant for hypotensive animals (arterial blood pressure of 40 ± 5 mmHg), has been determined in 0.473 ± 0.03 ml × g<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup> (brain cortex), and 0.608 ± 0.06 ml × g<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup> (cerebellum). During hypotension there is a marked decrease in the permeability constant of <sup>86</sup>Rb at the blood-brain barrier of rats.

**Key words:** Blood-brain barrier, Cerebrospinal fluid, Homeostasis, Potassium transport, Rubidium.

Los estudios sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE)

de ratas para el potasio, demuestran que, bajo condiciones normales, el contenido de este ión se mantiene constante en el cerebro frente a amplias variaciones en la concentración del mismo en el plasma (3-5, 30). La BHE se comporta como una membrana altamente selectiva (10-18, 20, 30, 31, 34) y posee un sistema de transporte específico para aminoácidos, azúcares y iones como el Na<sup>+</sup> y el K<sup>+</sup> (8). La selectividad iónica de ciertos substratos electrolitos a nivel de las membranas parece estar determinada por regiones polares discretas de la misma (37). Está firmemente establecido que los iones

\* Parte de este trabajo ha sido presentado en la reunión de la Physiological Society (London Microcirculation Group), el 12 de noviembre de 1983, en el Queen Elizabeth Medical School, Londres (introducido por los Dres. M. Bradbury y D. Yudilevich).

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse toda la correspondencia: Avenida Baleares, 67 D, puerta 22, 46023 Valencia (España).

<sup>2</sup> Department of Neurosurgery, University of Newcastle Upon Tyne, Newcastle, NE1 7RU, U.K.

como el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  atraviesan la BHE a nivel de la zonulae occludentes (3, 30). Las uniones endoteliales son realmente canales hidrofílicos célula-célula, constituyendo estructuras ideales para el control del crecimiento celular (25), cuya función más importante es el mantener la homeostasis (26).

El transporte de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  está determinado por una ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependiente similar a la que se encuentra en los plexos coroideos, siendo esta característica única para los vasos cerebrales del sistema nervioso. La capacidad de transporte de  $\text{Na}^+$  o de  $\text{K}^+$  está ligada a la presencia, en el tejido, de las ATPasas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependientes (8).

En estudios realizados *in vitro* se ha observado que la incorporación del  $\text{Rb}^{86}$  a los vasos cerebrales de rata es sensible a la ouabaina y dependiente de la temperatura. Al comparar la fijación del  $\text{Rb}^{86}$  entre los vasos cerebrales y el plexo coroideos, se ha visto que los primeros tienen mayor afinidad por el substrato en orden de 2,8 veces (8).

Todo ello sugiere que, las concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y de su análogo  $\text{Rb}^{86}$  en el líquido extracelular, están controladas por el mismo proceso que determina su presencia en el LCR (8). Por ello, la BHE juega un papel activo en la homeostasis para el  $\text{K}^+$  y la formación del líquido extracelular (3, 30).

Recientemente (35), mediante el uso de electrodos sensibles, se ha encontrado que ratas hipotensas muestran un incremento en la permeabilidad para el  $\text{K}^+$  en dirección hacia el cerebro, según lo cual los astrocitos se encargarían de amortiguar el exceso de iones, manteniendo la concentración normal. En este trabajo se sugiere que existe una ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependiente, sensible a situaciones como la anoxia y la hipotensión, presentes a nivel de la BHE. Esta interpretación se ha visto complicada por la hiperkalemia que se desarrolla, la cual, ante aumentos de  $\text{K}^+$  del orden de

8 mEq/l produce una vasodilatación arteriolar e incremento en el flujo plasmático (23).

Para dilucidar si realmente hay incremento en la cinética del transporte de  $\text{K}^+$  ante estas circunstancias, hemos utilizado la técnica de dilución de un indicador según ha sido previamente descrita (2, 3, 14, 15, 19, 21, 30), usando el ión  $\text{Rb}^{86}$  como análogo del  $\text{K}^+$ .

### Material y métodos

Se ha seguido la técnica ya descrita con ciertas variantes (14, 15, 19, 21). Se formaron tres lotes de 15 ratas adultas Sprague-Dawley cada uno, de unos  $360 \pm 20$  g. A las ratas de un grupo, previamente anestesiadas con pentobarbital (May and Baker) (40 mg ip), se indujo hipotensión arterial ( $40 \pm 5$  mmHg) mediante la extracción de sangre con jeringa heparinizada. Las de un segundo grupo, anestesiadas de manera similar, se consideraron controles (tensión arterial de  $100 \pm 3$  mmHg). El tercer grupo corresponde a ratas anestesiadas mediante halotano (2,5 %) (May and Baker), con presión positiva y también con hipotensión ( $40 \pm 5$  mmHg) provocada mediante la extracción de sangre. Las ratas estaban en ayunas 24 h antes del experimento, con agua *ad libitum*. La glucemia sanguínea se determinó mediante el test de la glucosa-oxidasa (6). La  $\text{PCO}_2$ , el  $\text{PO}_2$  y el pH se determinaron en un Radiometer (Copenhague). El hematócrito se evaluó mediante capilares heparinizados, en una centrífuga Hettich. La concentración de electrolitos se determinó por espectrofotometría de llama (9, 22). La bomba de ventilación utilizada es de la casa Scientific and Research Instruments, Surrey. El animal se mantiene a  $37^\circ\text{C}$  mediante una almohadilla con termostato y verificada con un termómetro en vía rectal.

Se han disecado e implantado catéteres heparinizados de polivinilo en la ar-

teria femoral, la vena femoral (ambas del mismo lado), y la arteria del rabo, mediante el uso de un microscopio quirúrgico Zeiss. El isótopo se perfunde por la vena femoral al comenzar el experimento. Se extrae continuamente sangre mediante el catéter de la arteria del rabo y se registra la presión arterial durante todo el tiempo, mediante un catéter acoplado a un transductor (La Electrónica, Inc.), acoplado a su vez a un fisiógrafo Gilson mod. 5/6.

Se han utilizado dos bombas (Harvard Apparatus Mod. 940), una para la infusión del isótopo y otra para la extracción, calibradas previamente con aceite mineral. La mezcla del isótopo Rb<sup>86</sup> (1 mCi/ml) (Amersham) se obtiene añadiendo 0,1 ml de Rb<sup>86</sup> a 2,5 ml de solución salina normal. Los demás reactivos son de Sigma. Los experimentos se realizaron una vez alcanzado un estado de equilibrio en la tensión arterial y en la bioquímica sanguínea, lo cual ocurría aproximadamente a los 15 min después de la traqueotomía a la que eran sometidas.

Después de 20 min de extracción continua, el animal es sacrificado mediante una guillotina y se extrae el hemisferio cerebral derecho, el hemisferio cerebral izquierdo y el cerebelo, que se guardan en recipientes previamente tarados. Todos los tejidos son desecados en un horno a 110°C durante veinticuatro horas, de tal manera que el contenido en agua represente un  $78,1 \pm 0,2$  %. Al día siguiente se realiza el conteo en un contador de centelleo Nuclear Enterprises Mod. 8311, provisto de un teletipo (Data Dynamics, Mod. 390). Posteriormente el tejido seco se extrae con NO<sub>3</sub>H 0,75 N y se homogeneiza durante otras veinticuatro horas en agitación continua, y se lleva a un fotómetro de llama (Buchler Cotlove) para determinar los electrolitos del plasma y de las muestras (tabla I y fig. 2). Todos los valores se expresan

como la media (1,33). Se ha empleado un ordenador Anaspec CBM Mod. 4032.

### Resultados y discusión

Los resultados concuerdan con los encontrados en la literatura (3, 5, 15, 30). La constante de permeabilidad para el Rb<sup>86</sup> a nivel de la BHE de la rata disminuye ante la hipotensión, lo cual contradice los resultados de STRONG (35).

Algunos autores han encontrado que iones como el Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> pueden difundir de célula a célula a través de canales hidrofílicos de muy baja resistencia, que podrían ser las uniones endoteliales (7), las cuales son propicias para la sincronización eléctrica de los tejidos excitables. La permeabilidad de las uniones endoteliales o zonulae occludentes podría estar determinada por el AMPc y quinasas específicas.

El control de la permeabilidad de las uniones endoteliales en los distintos te-

Tabla I. Constantes biológicas durante los experimentos.

Parámetro	Control	Hipotensión
Presión arterial (mmHg)	100,00 ± 3,00	40,00 ± 5,00
Hematocrito (%)	44,00 ± 2,00	33,00 ± 2,00
P <sub>o<sub>2</sub></sub> (mmHg)	103,00 ± 15,00	84,00 ± 12,00
P <sub>co<sub>2</sub></sub> (mmHg)	33,00 ± 2,00	28,00 ± 3,00
pH arterial	7,41 ± 0,02	7,46 ± 0,07
Glucosa (arterial) (mmol)	9,10 ± 0,10	9,10 ± 0,10
Temperatura rectal (°C)	37	37
K <sup>+</sup> plasmático (mmol)	3,63 ± 0,11	4,70 ± 0,16
Na <sup>+</sup> plasmático (mmol)	142,40 ± 0,30	148,30 ± 0,70
Cl <sup>-</sup> plasmático (mmol)	106,20 ± 0,80	108,90 ± 0,80

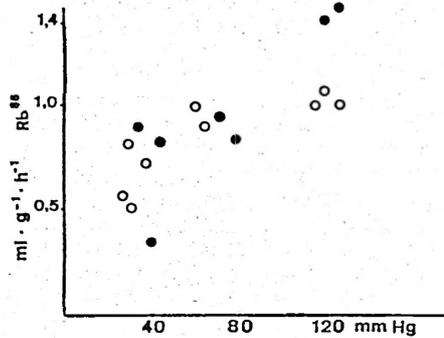


Fig. 1. Difusión del  $Rb^{86}$  a nivel de la BHE de la rata.

La constante de permeabilidad se ha expresado en  $ml \times g^{-1} \times h^{-1}$ , versus la presión arterial medida en mmHg. Cada punto representa tres experimentos. Los valores encontrados para el grupo control son:  $0,926 \pm 0,02 ml \times g^{-1} \times h^{-1}$  (corteza cerebral) y de  $1,107 \pm 0,12 ml \times g^{-1} \times h^{-1}$  (cerebelo). Los valores obtenidos para los animales sometidos a hipotensión son:  $0,473 \pm 0,03 ml \times g^{-1} \times h^{-1}$  (corteza cerebral) y de  $0,608 \pm 0,06 ml \times g^{-1} \times h^{-1}$  (cerebelo). La constante de permeabilidad para el  $^{86}Rb$  a nivel de la BHE de la rata es dependiente de la presión arterial.  $\circ$  = corteza cerebral;  $\bullet$  = cerebelo.

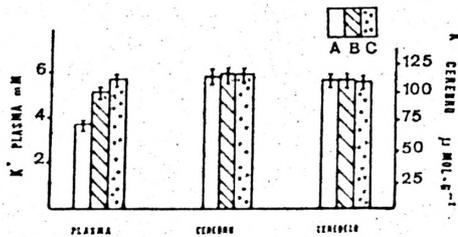


Fig. 2. Concentración del ión  $K^+$  en el plasma y en el tejido cerebral húmedo.

A) Animales control; B) Animales sometidos a hipotensión; C) Ratas sometidas a hipotensión, anestesiadas con halotano. Los resultados se expresan como  $x \pm SEM$ , para  $n = 12$  en cada grupo experimental. Existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre A y C (plasma).

jididos demuestra una sensibilidad distinta para la  $PCO_2$ , el pH y el  $Ca^{++}$  plasmático (32). La  $PCO_2$  influye en el pH y, además, parece que el  $Ca^{++}$  plasmático juega un papel importante. Se ha visto (15, 17), además, que ratas hipertensas (tensión arterial de 120 mmHg) sometidas a hipoxia ( $PO_2 = 53 \pm 4$  mmHg), muestran una disminución en la permeabilidad para el  $Rb^{86}$ , del orden de  $0,24 \pm 0,01 ml \times g^{-1} \times h^{-1}$  (corteza cerebral) y de  $0,32 \pm 0,03 ml \times g^{-1} \times h^{-1}$  (cerebelo).

El  $K^+$  es uno de los iones más fácilmente traslocables de la célula. Los anestésicos son responsables de falsos resultados (30); el halotano incrementa el flujo sanguíneo cerebral mediante una acción directa vasodilatadora (29) y la concentración del  $K^+$  en el plexo coroides del gato no varía a pesar de una elevación de este ión en el plasma del orden de 4 mM (30).

El halotano sólo es útil como anestésico a concentraciones mayores de 0,74 volúmenes %. Se ha empleado aquí una concentración de 2,5 % (29). Un efecto secundario de los barbitúricos es la hipotensión por liberación de histamina (29, 30, 34). Sin embargo, los efectos secundarios del halotano no son claros del todo, ya que algunos autores han encontrado una disminución en el flujo sanguíneo con disminución a su vez de la oferta de  $O_2$  al tejido (28, 34).

En condiciones de hipoxemia se observa un incremento en el flujo sanguíneo cerebral (27) con marcadas dilataciones en el calibre de los vasos cerebrales ante una hipoxia. Un incremento en la  $PCO_2$  no parece afectar notablemente la circulación cerebral si el pH se mantiene constante (34). Parece ser que el pH del LCR es el factor más importante en el control del calibre de los vasos sanguíneos y por lo tanto, del flujo plasmático (34, 36). En experimentos en perro, se ha encontrado que el flujo sanguíneo cerebral no dependía del pH sangüí-

neo (24), y en fetos de cabra, que una reducción en la presión parcial de O<sub>2</sub> incrementa el flujo sanguíneo cortical (28). Por lo que se puede deducir que el flujo sanguíneo cerebral es independiente del pH plasmático.

Por otra parte, un aumento del K<sup>+</sup> extracelular del orden de 8 mEq/l es responsable de una vasodilatación arteriolar y un aumento sanguíneo (23). De acuerdo con ello la vasodilatación producida por el incremento en el K<sup>+</sup> extracelular se debería a una estimulación de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. La reducción en el K<sup>+</sup> extracelular produciría una vasoconstricción arteriolar mediante una inhibición de dicha bomba (23).

GARDINER (18) ha observado que, en condiciones de hiponatremia hipoosmolar se presenta una caída en el flujo sanguíneo cerebral y un aumento en el transporte de iones de K<sup>+</sup> desde el tejido cerebral y el LCR hacia la circulación sanguínea en los animales de experimentación; sin embargo, no tiene en cuenta los efectos secundarios de los fármacos utilizados.

Los datos de STRONG *et al.* (35) se podrían explicar porque el K<sup>+</sup> penetra masivamente en los eritrocitos en el período de dos horas que le dura su experimento; porque al introducir su microelectrodo en la vena glenoide se produzcan áreas de isquemia o porque las muestras de sangre no sean representativas del área del cerebro que se estudia. Las muestras de sangre obtenidas del seno sagital incluyen sangre de las anastomosis diploicas y del tejido subcortical.

El halotano posee efectos secundarios incluyendo complicaciones cardíacas (arritmias, incremento en la sensibilidad del nódulo S-A) (29). La significativa liberación de K<sup>+</sup> plasmático podría constituir una de ellas (fig. 2). Un incremento en el K<sup>+</sup> plasmático no afecta la composición del LCR (5). Este es uno de los argumentos más firmes para aceptar que la BHE mantiene la homeostasis del

LCR. La concentración del K<sup>+</sup> a nivel del tejido cerebral (corteza y cerebelo), se mantiene constante en los tres grupos de ratas (fig. 2).

En resumen, al disminuir la presión arterial sistémica, disminuye la constante de permeabilidad del Rb<sup>86</sup> a nivel de la BHE de la rata.

#### Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la CIBA Foundation, la Wellcome Trust, el Medical Research Council (England) y el British Council. C. F. ha sido beneficiario de una beca del British Council. Asimismo, expresamos nuestro agradecimiento a la señora Janet Mary Pick por su experta asistencia técnica.

#### Resumen

Estudios sobre la permeabilidad del potasio a nivel de la BHE de la rata demuestran que, en condiciones normales, la concentración de este ión se mantiene constante en el cerebro a pesar de que se presenten amplias variaciones del mismo en el plasma. Se ha utilizado el Rb<sup>86</sup> como análogo del ión K<sup>+</sup>. La constante de permeabilidad para los animales control (tensión arterial de 100 ± 3 mmHg) ha sido evaluada en 0,926 ± 0,02 ml × g<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup> (corteza cerebral), y en 1,107 ± 0,12 ml × g<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup> (cerebelo).

La constante de permeabilidad para los animales hipotensos (tensión arterial de 40 ± 5 mmHg), se ha evaluado en 0,473 ± 0,02 ml × g<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup> (corteza cerebral) y en 0,608 ± 0,06 ml × g<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup> (cerebelo). Durante la hipotensión, disminuye la permeabilidad del <sup>86</sup>Rb a nivel de la BHE de la rata.

#### Bibliografía

1. BANCROFT, H.: Introducción a la estadística, Atika, S. A., Madrid, 1966, pp. 67-95.
2. BASSINGTHWAIGHTE, J. B.: *Fed. Proc.*, **41**, 3031-3032, 1982.
3. BRADBURY, M. W. B.: The concept of a blood-brain barrier, Chichester, John Wiley and Sons, Londres, 1979, pp. 73-146.

4. BRADBURY, M. W. B.: *Proc. Int. U. Physiol. Sci.*, Budapest, 1980, A-98.
5. BRADBURY, M. W. B. y KLEEMAN, C. R.: *Am. J. Physiol.*, **213**, 519-528, 1967.
6. CHRISTENSEN, N. J.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **18**, 379-384, 1967.
7. DE MELLO, W.: *Fed. Proc.*, **43**, 2692-2696, 1984.
8. EISENBERG, H. M. y SUDITH, R. L.: *Science*, **206**, 1083-1085, 1979.
9. EWES, E. A.: *Quantitative problems in biochemistry* (J. N. Davidson, ed.); E. S. Livingstone, Londres, 1967, pp. 195-214.
10. FONT, C. y GARCÍA CAMPOS, M.: *Medicina*, **50**, 260-272, 1982.
11. FONT, C., GARCÍA-CAMPOS, M., HANSEN, A. J., SIEMKOWICZ, E. y GJEDDE, A.: *Gastroenterol. Clin. Biol.*, **6**, 96, 1982.
12. FONT, C., GARCÍA-CAMPOS, M., HANSEN, A. J., SIEMKOWICZ, E. y GJEDDE, A.: *II Congreso de la F.E.S.B.E.*, Madrid, 1981, A-431.
13. FONT, C., GARCÍA-CAMPOS, M., HANSEN, A. J., SIEMKOWICZ, E. y GJEDDE, A.: *Rev. esp. Fisiol.*, **38**, 317-320, 1982.
14. FONT, C., GARCÍA-CAMPOS, M., HANSEN, A. J., SIEMKOWICZ, E. y GJEDDE, A.: *Laboratorio*, **73**, 499-506, 1982.
15. FONT, C.: Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, 1984.
16. FONT, C., HANSEN, A. J., SIEMKOWICZ, E. y GJEDDE, A.: *Proc. Int. Soc. Neurochem.*: Phospholipid metabolism in the nervous system, Birmingham, U.K., 1981, A-60.
17. FONT, C., BRADBURY, M. W. B., STRONG, A. J. y PLAGARO-CORDERO, M. E., 1984. (En Prensa.)
18. GARDINER, M.: *J. Physiol. (London)*, **306**, 463-472, 1980.
19. GJEDDE, A., HANSEN, A. J. y SIEMKOWICZ, E.: *Acta Physiol. Scand.*, **108**, 321-330, 1980.
20. GJEDDE, A.: *Acta Physiol. Scand.*, **108**, 331-339, 1980.
21. GJEDDE, A.: *J. Neurochem.*, **36**, 1463-1471, 1981.
22. GOULDING, K. H.: En «Principles and techniques of practical biochemistry (B. L. Williams y K. Wilson, eds.), Edward Arnold Publ., Londres, 1975, pp. 170-198.
23. HADDY, F. J.: *Fed. Proc.*, **42**, 239-245, 1983.
24. HARPER, A. M. y BELL, R. A.: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **26**, 341-344, 1963.
25. LOEWENSTEIN, W. R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **560**, 1-65, 1979.
26. LOEWENSTEIN, W. R.: *Physiol. Revs.*, **61**, 829-913, 1981.
27. NOELL, W. y SCHNEIDER, M.: *Pflügers Arch.*, **246**, 182-200, 1941.
28. PARKER, H. R. y PURVES, M. J.: *Q. J. Exp. Physiol.*, **52**, 205-221, 1967.
29. PRICE, L.: En: «The Pharmacological basis of Therapeutics» (L. S. Goodman y A. Gilman, eds.), MacMillan Publ. Co. Inc., Nueva York, 1975, pp. 89-96.
30. RAPOPORT, S. I.: *Blood-brain barrier in physiology and medicine*, Raven Press, Nueva York, 1976, pp. 43-86.
31. RAPOPORT, S. I.: *Proc. Int. U. Physiol. Sci.*, Budapest, 1980, A-509.
32. REVEL, J. P., NICHOLSON, B. J. y YANCEY, S. B.: *Fed. Proc.*, **43**, 2672-2677, 1984.
33. RÍOS, S.: *Iniciación estadística*, Ediciones ICE, Madrid, 1977, pp. 187-225.
34. SIESJÖ, B.K.: *Brain energy metabolism*, John Wiley and Sons, Londres, 1978, pp. 211-263.
35. STRONG, A. J., MORII, S., NGAI, A. C. y WINN, H. R.: *J. cereb. blood flow metabol.*, **3**, Suppl. 1, S 638-639, 1983.
36. WALKER, J. y BROWN, A. M.: *Science*, **167**, 1502-1504, 1970.
37. WRIGHT, E. M. y DIAMOND, J. M.: *Ann. Rev. Physiol.*, **31**, 581-646, 1969.