

## Efecto de la hemorragia subaracnoidea experimental sobre la incorporación de calcio y la inervación adrenérgica en arterias cerebrales de gato\*

J. Marin \*\*, F. Rivilla, M. Salaices, R. D. Lobato, J. Burgos, C. F. Sánchez-Ferrer y A. Fernández

Departamento de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina. Universidad Autónoma  
28029 Madrid (España)

(Recibido el 28 de septiembre de 1984)

J. MARIN, F. RIVILLA, M. SALAICES, R. D. LOBATO, J. BURGOS, C. F. SANCHEZ-FERRER y A. FERNANDEZ. *Effects of Experimental Subarachnoid Hemorrhage on the Calcium Uptake and on the Adrenergic Innervation of Cat Cerebral Arteries*. Rev. esp. Fisiol., 41, 381-386. 1985.

The effect of experimental subarachnoid hemorrhage (SAH) on the adrenergic innervation and on the  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake of cat cerebral arteries was analyzed. Intracisternal injections of autologous blood reduced the noradrenaline content of perivascular nerve endings and  $^3\text{H}$ -noradrenaline uptake. These values returned to normal levels in a period of two weeks after SAH. The activity of dopamine-beta-hydroxylase was also reduced 3 and 7 days after SAH. Superior cervical gangliectomy and intracisternal injection of 6-hydroxydopamine also reduced these three parameters. The uptake of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  by arteries from animals submitted to SAH was greater than if the blood vessels were from untreated cats. Lanthanum brought about a less  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  displacement in the arterial segments from untreated animals than in those from cats after SAH. These results suggest that SAH induces a transient adrenergic denervation as well as changes in the membrane of smooth muscle cell which increase the quantity of  $\text{Ca}^{2+}$  bound to it. All these modifications might be involved in the cause of chronic cerebral vasospasm that appears after SAH.

**Key words:** Adrenergic innervation, Cat cerebral arteries, Subarachnoid hemorrhage.

Se ha comprobado que la hemorragia subaracnoidea (HSA) disminuye transitoriamente la histofluorescencia del plexo nervioso adrenérgico que acompaña a las arterias cerebrales (6, 11, 13). También se ha descrito que los vasos piales de animales sometidos a HSA experimental

desarrollan una supersensibilidad a noradrenalina (NA) similar a la observada después de la denervación quirúrgica o química del lecho vascular cerebral (4, 9, 13). Estos hallazgos parecen indicar que las terminaciones nerviosas adrenérgicas cerebrovasculares poseen un importante papel en la producción del vasoespasm cerebral.

El presente trabajo tiene como objeto estudiar en arterias cerebrales los efectos de la HSA sobre la inervación simpática

\* Trabajo subvencionado en parte con ayudas de la CAICYT y FIS.

\*\* A quien debe dirigirse la correspondencia.

y la incorporación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Con respecto a la inervación adrenérgica se analizaron las modificaciones que la HSA produce en el contenido de NA, incorporación de  $^3\text{H-NA}$  y en la actividad de dopamina-beta-hidroxilasa (DBH). Estas modificaciones se compararon con las producidas por la gangliectomía cervical superior y la inyección intracisternal de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), procedimientos que producen denervación adrenérgica quirúrgica y química (5, 14), respectivamente.

### Material y métodos

Se han utilizado gatos machos y hembras (2-4 kg) anestesiados con pentobarbital (35 mg/kg, i.p.). Con objeto de provocarles una HSA experimental a los animales de un grupo se les inyectó 1 ml de suero autólogo en la cisterna magna. Para ello, una vez expuesta la duramadre que recubre la región cervical a nivel de la articulación occipito-atloidea, se introdujo un catéter de polietileno, cuya punta se situó a nivel de la cisterna magna, y a través del mismo se administró lentamente el suero. A otros animales se les extirparon ambos ganglios cervicales superiores. Los de un tercer grupo fueron pretratados con 5 mg de 6-OHDA intracisternal disueltos en una solución semejante a la del líquido cefalorraquídeo, cuya composición expresada en concentración mM fue:  $\text{Na}^+$ , 156;  $\text{K}^+$ , 3;  $\text{Ca}^{2+}$ , 1,5;  $\text{Cl}^-$ , 151; y, 0,01 % (peso/volumen) de ácido ascórbico para reducir la oxidación de 6-OHDA. Un grupo adicional de gatos, sin tratamiento, sirvió como control.

Los gatos, previamente anestesiados, se sacrificaron por exanguinación mediante sección de la arteria carótida. Posteriormente se les extrajo cuidadosamente el cerebro y las arterias del polígono de Willis con sus ramas (10-15 mg), a las que se les quitó la sangre intraluminal en una placa de Petri que contenía Krebs-

Henseleit (K-H) frío (4°C) y oxigenado con una mezcla gaseosa de 95 %  $\text{O}_2$  y 5 %  $\text{CO}_2$ .

La capacidad de los vasos cerebrales de cada grupo de animales para incorporar  $^3\text{H-NA}$ , se determinó colocando las arterias de cada animal en una red cilíndrica de nylon que se sumergió durante 15 min en una solución oxigenada de K-H a 37°C. Después, el tejido se expuso a  $^3\text{H-NA}$  ( $2 \times 10^{-7}$  M, actividad específica 10,5 Ci/mmol) durante 30 min y se lavaron durante otros 30 min con K-H oxigenado a 37°C, introduciendo las redcillas cada 10 min en unos viales que contenían 4 ml de líquido nutritivo. Por último, las arterias se secaron suavemente con papel de filtro, se pesaron y homogeneizaron en 0,5 ml de ácido perclórico 0,4 N y se centrifugaron a 3000 g durante 15 min. A 0,1 ml de sobrenadante se añadieron 10 ml de líquido de centelleo Bray (2) y la radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido Nuclear Chicago modelo ISOCAP 300. Los resultados se expresan en cpm/mg de tejido.

El contenido de NA de las arterias cerebrales se midió según el método de HENRY *et al.* (8). Para ello, se pesaron y homogeneizaron en 1 ml de ácido perclórico y se centrifugaron a 15000 g durante 15 min. Los resultados se expresan en  $\mu\text{g/g}$  de tejido.

Para determinar la actividad de DBH, las arterias aisladas se pesaron y homogeneizaron en 100 volúmenes de solución tampón tris 5 mM, pH 6,8, conteniendo tritón X-100 al 0,2 % y seroalbúmina bovina al 0,25 %. El homogeneizado se centrifugó a 27000 g durante 15 min a 4°C y la actividad de DBH se valoró, el mismo día, según el método de MOLINOFF *et al.* (10). Una muestra del homogeneizado se analizó paralelamente con una solución que contenía DBH de glándula adrenal bovina para controlar la posible acción de los inhibidores endógenos. La recuperación de la concentración es-

tándar de DBH fue del 90 al 100 % y la concentración de cobre que dio la máxima actividad enzimática osciló entre 20 y 30 nM. La primera reacción (formación de octopamina) fue realizada durante una hora a pH 5 y la segunda (formación de N-metil-octopamina) durante 30 min a pH 8,6. Los resultados se expresan en nmoles de octopamina formada a partir de tiramina por hora y por gramo de tejido.

El calcio radiactivo incorporado por las arterias cerebrales se valoró según el método de TURLAPATY *et al.* (15), que es una adaptación del previamente descrito por GODFRAIND (7). Para ello, los vasos se colocaron en una red cilíndrica de nylon que se sumergió durante 5 min en un vial que contenía 4 ml de solución de K-H oxigenada a 37°C con  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  ( $6,06 \times 10^{-6}$  M, actividad específica 1,91 Ci por ml). Transcurrido este tiempo las arterias se lavaron con K-H frío (4°C) durante 20 s para separar el  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  que no estuviera ligado al tejido, o con una solución de  $\text{LaCl}_3$  50 mM durante 5 min.

Por último, las arterias se secaron cuidadosamente con papel de filtro, se pesaron e introdujeron en 5 ml de solueno (disolvente tisular) durante 4 h a 55°C. Posteriormente se añadieron 0,2 ml de HCl 2 N y 4 ml de líquido de centelleo, y se midió la radiactividad.

El  $\text{LaCl}_3 \cdot \text{HCl}$ , el Tris, la tiramina · HCl y la albúmina bovina son de Sigma; el solueno R-100 y el Triton X-100, de Packard; el  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  y el d,1(7- $^3\text{H}$ )-noradrenalina son de Amersham.

El análisis estadístico de los datos se realizó según el método de SNEDECOR y COHRAN (12). La significación estadística entre dos grupos de experimentos se determinó por la «t» de Student y se tomó como significativo el valor de  $p < 0,05$ .

### Resultados

La hemorragia subaracnoidea (HSA) realizada 3 y 7 días antes del experimen-

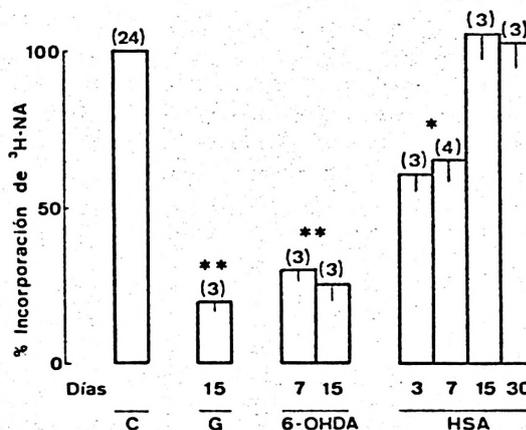


Fig. 1. Incorporación de  $^3\text{H}$ -NA en arterias cerebrales de gatos controles (C), gangliectomizados (G), tratados con 6-OHDA y HSA. El 100 % de incorporación fue de  $1.459 \pm 105$  cpm/mg de tejido. Entre paréntesis figura el número de animales utilizados en cada determinación. Cada columna representa la media  $\pm$  ES. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ .

to redujo la incorporación de  $^3\text{H}$ -NA a un 60 %, respecto a los controles, volviendo a los niveles normales a partir de los 15 días de la hemorragia. Esta inhibición fue mayor con la gangliectomía cervical superior o con la administración de 6-OHDA intracisternal que con la HSA (fig. 1).

La concentración de NA en las arterias de los animales controles fue de  $1,34 \pm 0,22 \mu\text{g/g}$  (tabla I). La HSA produjo una reducción del contenido en NA de estos vasos. Tres días después de la hemorragia los niveles disminuyeron significativamente y dos semanas más tarde se observó una tendencia a la normalización de los mismos. La extirpación quirúrgica de ambos ganglios cervicales superiores 15 días antes del experimento y el pretratamiento con 6-OHDA intracisternal redujeron significativamente el contenido de NA (tabla I).

La actividad de DBH en las arterias cerebrales de gatos controles fue de  $96 \pm 16$  nmol/h/g (tabla I). Esta actividad

Tabla I. Contenido de NA y actividad de DBH ( $\bar{x} \pm ES$ ) en las arterias de la base del cerebro de gatos controles y de gatos sometidos a diferentes tratamientos experimentales. Los números entre paréntesis indican los experimentos realizados.

Tratamiento	Días	Contenido de NA ( $\mu\text{g/g}$ )	Actividad de DBH (nmol/h/g)
Control		$1,34 \pm 0,22$ (5)	$96 \pm 16$ (6)
Gangliectomía	15	$0,12 \pm 0,03$ (5)*	$12 \pm 5$ (3)**
6-OHDA	3	Indetectable (3)	ND
	7	Indetectable (3)	$10 \pm 10$ (3)**
	15	Indetectable (3)	ND
HSA	3	$0,06 \pm 0,05$ (3)**	$10 \pm 3$ (3)**
	7	$0,28 \pm 0,20$ (3)*	$14 \pm 3$ (3)**
	15	$0,89 \pm 0,40$ (3)	ND
	30	$1,02 \pm 0,30$ (3)	ND

\*  $p < 0,025$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; ND = No determinado.

disminuyó marcadamente en arterias cerebrales de gatos sometidos a HSA 3 y 7 días antes de la determinación bioquí-

mica. La extirpación de ambos ganglios cervicales superiores o la administración de 6-OHDA intracisternal provocó una reducción de la actividad de DBH similar a la inducida por la HSA.

La cantidad de radiactividad almacenada por las arterias cerebrales de gatos sometidos a HSA tres días antes del experimento, después de su incubación con  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  y posterior lavado con K-H frío, fue significativamente superior (186 %) a la retenida por las arterias de gatos controles (fig. 2). Sin embargo, cuando se lavaron con lantano 50 mM se produjo una marcada reducción de la radiactividad incorporada, tanto por las arterias controles (62 %) como por las de gatos sometidos a HSA (58 %).

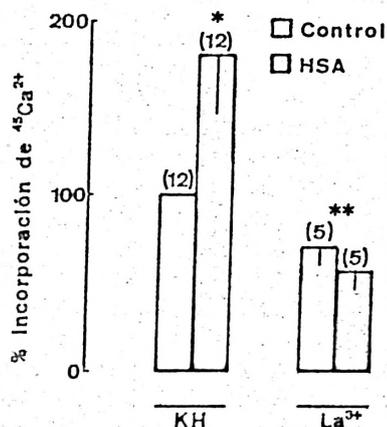


Fig. 2. Influencia de la HSA y del lavado con lantano sobre la incorporación de calcio radiactivo por las arterias cerebrales de gatos controles y sometidos a HSA tres días antes del experimento.

El 100 % de incorporación fue de  $3,65 \pm 0,68$  mmoles de  $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{kg}$ . Los símbolos son iguales a los de la figura 1 (\*  $p < 0,025$ ; \*\*  $p < 0,005$  respecto a las arterias de gatos controles lavadas con K-H).

## Discusión

Los resultados obtenidos muestran que la HSA produce en las arterias cerebrales de gato una disminución en el contenido de NA y en la incorporación de  $^3\text{H-NA}$ . La recuperación progresiva de estos dos índices de inervación adrenérgica en un período de 15 días después

de la hemorragia, parece indicar que esta situación patológica provocaría una alteración transitoria del plexo nervioso simpático perivascular. La reducción en el contenido de NA y en la capacidad para incorporar  $^3\text{H-NA}$  fue superior con la gangliectomía cervical superior o con el pretratamiento con 6-OHDA intracisternal que con la HSA, lo que indica que estos dos procedimientos inducen una mayor y más prolongada denervación adrenérgica que la que produce la HSA.

Por otra parte, la actividad de DBH fue considerablemente reducida en las arterias cerebrales de gato sometidas a HSA 3 y 7 días antes del ensayo bioquímico. Esta disminución en la actividad enzimática fue similar a la encontrada en arterias cerebrales de gatos a los que se les había extirpado ambos ganglios cervicales superiores o administrado intracisternalmente 6-OHDA. Estos resultados confirman que la HSA, al igual que la gangliectomía y la 6-OHDA, produce una denervación de las terminaciones nerviosas adrenérgicas que inervan las arterias cerebrales, puesto que esta enzima está localizada específicamente en las neuronas adrenérgicas (1, 3). Los resultados aquí expuestos están de acuerdo con los obtenidos por SVENDGAARD *et al.* (13) en arteria basilar de conejo, quienes observaron que la HSA parece producir una denervación simpática, ya que disminuye la histofluorescencia adrenérgica específica en estos vasos. Es bien conocido que la denervación quirúrgica y química destruye el principal mecanismo de inactivación de la NA liberada en las terminaciones nerviosas adrenérgicas, es decir, la incorporación del neurotransmisor tras su liberación de las mismas, y por tanto, la NA circulante o la exógena alcanzaría mayor concentración a nivel de los receptores, lo que explicaría el vasoespasma inducido por la HSA.

Cuando la HSA se realiza tres días antes del experimento, el calcio radiactivo retenido por las arterias cerebrales se du-

plica, lo que sugiere que la HSA altera la membrana de la célula muscular lisa de las arterias cerebrales haciéndola más permeable a la entrada, o a la fijación de este ión, lo cual explicaría la potenciación de la respuesta a diferentes agentes vasoactivos (9, 13). Cuando, después de la incubación con  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , las arterias se lavaron con un medio que contenía lantano, el calcio radiactivo fijado a las arterias cerebrales controles disminuyó del 100 al 62 %, mientras que en las arterias de gatos sometidos a HSA fue del 186 al 58 %. El lantano es un ión que no sólo bloquea la entrada de calcio, sino que desplaza la fracción unida a la membrana celular y, además, no penetra en condiciones normales al interior de la célula (16). Estos hechos indican que la HSA daña a las células musculares lisas de las arterias cerebrales aumentando la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  unido a las mismas y la accesibilidad del  $\text{La}^{3+}$  para desplazarlo.

En conclusión, la HSA parece inducir una denervación adrenérgica transitoria y una alteración de las membranas de las células musculares lisas de las arterias cerebrales, dando lugar a un incremento de la permeabilidad para el calcio. Estos fenómenos pueden estar relacionados con la supersensibilidad a diversos agentes vasoactivos desarrollada por las arterias cerebrales después de la HSA.

### Resumen

Se estudian los efectos de la hemorragia subaracnoidea (HSA) experimental sobre la inervación adrenérgica y la incorporación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en arterias cerebrales de gato. La inyección intracisternal de suero autólogo reduce el contenido de noradrenalina de las terminaciones simpáticas perivasculares y la incorporación de noradrenalina tritiada, volviendo a la normalidad a las dos semanas de la HSA. Igualmente se reduce la actividad de dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (DBH) determinada a los 3 y 7 días de la HSA. La gangliectomía cervical superior y la inyección intracisternal de 6-hidroxidopamina

también disminuyen estos tres parámetros. Las arterias procedentes de animales sometidos a HSA incorporan más  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  que las de los controles, y más calcio desplazado por lantano. Estos datos sugieren que la HSA induce una denervación adrenérgica transitoria de las arterias cerebrales y una alteración en la membrana de la célula muscular lisa, la cual incrementa la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  unido a ella; cambios que pueden estar relacionados con el vasoespasmismo cerebral crónico que aparece después de la HSA.

### Bibliografía

1. BELPAIRE, F. y LADURON, P.: *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 411-416, 1968.
2. BRAY, G. A.: *Analyt. Biochem.*, **1**, 279-285, 1960.
3. CHUBB, I. W., DE POTTER, W. P. y DE SCHAEFDRIYER, A. F.: *Nature*, **228**, 1203-1207, 1970.
4. DUCKLES, S. P., KIM, J. y BEVAN, R. D.: *Stroke*, **8**, 10, 1977.
5. EMMELIN, H. y TRENDELENBURG, U.: *Erbeg. Physiol.*, **66**, 147-211, 1972.
6. FRASER, R. A. R., STREIN, B. M. y BARRER, R. E.: *Stroke*, **1**, 356-362, 1970.
7. GODFRAIND, T.: *J. Physiol.*, **260**, 21-29, 1976.
8. HENRY, D. P., STARMAN, B. J., JOHNSON, D. G. y WILLIAMS, R.: *Life Sci.*, **16**, 375-384, 1975.
9. LOBATO, R. D., MARÍN, J., SALAICES, M., RIVILLA, F. y BURGOS, J.: *J. Neurosurg.*, **53**, 480-485, 1980.
10. MOLINOFF, P. B., WEINSHILBOUM, R. y AXELROD, J.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **178**, 425-431, 1971.
11. PEERLES, S. J. y KENDALL, M. J.: En «Cerebral Vascular Disease» (J. P. Whisnant y B. A. Sandok, eds.). Grune and Stratton, Nueva York, 1975, pp. 49-58.
12. SNEDECOR, G. W. y COHRAN, N. G.: *Statistical Methods* (6.ª ed.). The Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1967.
13. SVENDGAARD, N. A., EDVINSSON, L., OLIN, T., OWMAN, C. y SAHLIN, C.: En «Neurogenic Control of the Brain Circulation» (C. Owmán y L. Edvinsson, eds.). Pergamon Press, Oxford, 1977, pp. 143-151.
14. THOENEN, N. y TRANZER, J. P.: *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **261**, 271-288, 1968.
15. TURLAPATY, P. D. M. V., ALTURA, B. T. y ALTURA, B. M.: *Experientia*, **35**, 639-645, 1979.
16. VAN BREEMEN, C., FARINAS, B. R., CASTEELS, R., GERBA, P., WUYTACK, G. y DETH, R.: *Philos. R. Soc. London (Biol.)*, **265**, 57-62, 1973.