

Comunicación n° 4:

ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN DIFERENTES MODELOS ANIMALES DE PATOLOGÍA HEPÁTICAS.

Autores: Lemberg Abraham¹, Fernández María Alejandra¹, Coll Carlos¹, Castaño Gustavo², Mallardi Pablo³, Filinger Ester Julia⁴.

¹ Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ² Hospital Zubizarreta, Consejo de Investigación del GCABA; ³ Hospital Thompson, Provincia de Buenos Aires; ⁴ Cátedra de Farmacia Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA y CONICET.

INTRODUCCIÓN

La barrera hematoencefálica (BHE) es una barrera anatómico funcional y constituye un mecanismo esencial para mantener la homeostasis del sistema nervioso central (SNC). Esto se logra, por un lado, restringiendo la entrada de sustancias químicas potencialmente dañinas para el sistema nervioso central, y por otro lado, permitiendo la entrada de nutrientes esenciales. La BHE está constituida por células endoteliales especializadas y se encuentra en íntima asociación con los podocitos (procesos de los astrocitos). Las células endoteliales se unen entre sí y a los astrocitos a través uniones de hendidura (GAP), uniones adherentes y uniones estrechas. Las uniones GAP están formadas por grupos de proteínas trans-membrana (conexinas) que conectan el citoplasma entre las células endoteliales. Las uniones adherentes están formadas por proteínas de la familia de las cadherinas, mientras que las uniones estrechas están compuestas de varias proteínas integrales y proteínas periféricas de membrana de la familia de las zonula ocludens. La expresión elevada de uniones estrechas es una característica especial de la BHE (1;2).

La permeabilidad de la BHE y su relación a las enfermedades hepáticas ha sido estudiada tanto en modelos de diversas enfermedades agudas como crónicas. El aumento de la permeabilidad de dicha barrera está relacionada con la patogenia de la encefalopatía hepática, y ha sido observado en animales con hipertensión portal, aún en ausencia de cirrosis, como ha sido estudiado por nuestro grupo (3).

La hipertensión portal y la encefalopatía hepática son complicaciones frecuentes de las hepatopatías crónicas, por ejemplo la cirrosis (4).

Se considera hipertensión portal, en humanos, a la presencia de presión portal mayor de 12 mm Hg o a un gradiente de presión entre la presión de la vena porta y la vena cava inferior mayor a 4 mm Hg. La presión portal está establecida entre dos parámetros: el flujo venoso portal y la resistencia al flujo en el interior del hígado. El flujo venoso portal está determinado y regulado por la sangre proveniente del área esplácnica y toda resistencia a ese flujo en un sector o en la totalidad del árbol portal se considera como hipertensión portal parcial o total respectivamente. La etiología de la hipertensión portal puede clasificarse en tres grandes grupos, prehepática, hepática y posthepática y como ejemplos característicos de cada grupo pueden mencionarse la trombosis de la vena porta, la cirrosis hepática y la Enfermedad de Budd-Chiari respectivamente.

El modelo animal empleado para reproducir la hipertensión portal prehepática está dado por la estrechez reglada de la vena porta prehepática, en ratas. A los 14 días se produce la hipertensión portal, con el hígado conservado. Experiencias anteriores con este modelo, muestran las alteraciones que se producen en regiones cerebrales asociadas a esta hipertensión portal (5-8).

Un alcaloide de la pirrolizidina, la monocrotalina (MCT), que se encuentra distribuida entre varias plantas (*Crotalaria*, *Heliotropium* y *Senecio*) resulta tóxica para seres humanos y animales, por ingesta de hierbas medicinales y tés conteniendo este alcaloide animales, su administración produce injuria hepática con necrosis, trombosis de venas hepáticas, lesiones en células endoteliales, congestión, e hipertensión portal, además de edema cardiopulmonar y elevación de endotelina-1.(9).

La colestasis es una enfermedad hepática que se caracteriza por una alteración en la producción o una disminución en el flujo de bilis al intestino, y puede presentar en casos severos ictericia, coluria y acolia. Se acompaña de alteraciones bioquímicas como elevación de bilirrubina, colesterol y sales biliares, entre otros parámetros, en plasma. Para reproducir este síndrome, se empleó la ligadura del conducto biliar común de la rata, que a los 21 días produce cirrosis y la sintomatología arriba mencionada en la rata. El objetivo de este estudio es describir alteraciones de la permeabilidad de la

BHE en modelos animales de diversas enfermedades hepáticas y del sistema portal. Se utilizaron para esta exposición 3 modelos experimentales en rata distintos que presentaron alteraciones en la permeabilidad de la BHE.

- 1- Hipertensión portal prehepática por estrechez reglada de la vena porta con hígado sano
- 2- Intoxicación por MCT
- 3- Colestasis producida por ligadura del conducto biliar común

Los tres modelos tienen en común la presencia de aumento de la presión portal, una moderada elevación del amonio en sangre y de parámetros de estrés oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron para todos los experimentos ratas Wistar macho con un peso promedio de 240-260 g., provenientes del bioterio de la Cátedra de Fisiopatología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Los animales se mantuvieron a temperatura y humedad controlada y acceso libre a comida y agua, con un ciclo de luz: 8 a.m. – 8 p.m. Todos los animales se manejaron de acuerdo a las condiciones indicadas por la guía de la Facultad de Farmacia y Bioquímica y aprobadas por el Comité de Ética de dicha Facultad.

- **Modelos experimentales**

1- Hipertensión portal prehepática

La hipertensión portal fue obtenida mediante una estenosis reglada de la vena porta de acuerdo a Chojkier et al (10). Las ratas fueron anestesiadas con éter y una incisión en la línea media abdominal fue realizada. La vena porta fue localizada y aislada de los tejidos contiguos. La vena porta fue ligada utilizando hilo de sutura de seda 3.0 y una aguja 20-gauge colocada a lo largo de la vena para realizar todas las ligaduras de igual diámetro. Luego la aguja es removida obteniéndose de esta forma, la ligadura reglada de la vena porta. Las cirugías fueron llevadas a cabo a las 2 p.m. teniendo en cuenta el ritmo circadiano. Catorce días después de la ligadura de la vena porta, los animales exhiben un aumento de la presión portal.

Las ratas control (Sham) tienen el mismo procedimiento experimental excepto la ligadura y posterior estenosis de la vena porta.

2- Intoxicación por MCT

Las ratas fueron inyectadas i.p. con una única dosis de MCT de 60 mg/Kg por peso corporal. El grupo control fue inyectado de igual forma con solución salina. A 44 días de la inyección de MCT, los animales fueron sacrificados por decapitación. Previamente a la decapitación fueron obtenidas muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR).

3- Ligadura del conducto biliar común de rata

Los animales fueron anestesiados con éter y una incisión en la línea media abdominal fue realizada. El conducto biliar común fue aislado y una doble ligadura fue realizada a nivel proximal una y otra a nivel distal de la bifurcación, utilizando hilo de seda. Entre ambas ligaduras se corta el conducto biliar común. Los animales del grupo control fueron anestesiados, el conducto biliar común es reconocido pero no ligado.

- **Determinación de la presión portal y del edema cerebral**

Presión portal

Catorce días después de la ligadura reglada de la vena porta o de la cirugía simulada (Sham) las ratas fueron anestesiadas con Fenobarbital sódico (40 mg/kg), intraperitonealmente. La presión portal fue medida por punción esplénica. La aguja fue canulada a un catéter de polietileno (50) con solución salina heparinizada (25 U/mL) y conectado a un transductor de presión Statham Gould P23ID (Statham, Hato Rey, Puerto Rico) conectado a un polígrafo Grass 79D (Grass Instruments, Quincy, MA).

Medida del contenido de agua del cerebro

Zonas corticales del cerebro fueron utilizadas para determinar el contenido de agua con el objetivo de cuantificar un posible edema cerebral. Se empleó un método gravimétrico de acuerdo a Marmarou et al. (11).

- **Caracterización de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica**
Perfusión transcárdica de Trypan Blue

Las ratas fueron perfundidas con una solución de Trypan Blue (TB, Sigma Chemical Co. St. Louis MO. USA). La solución de TB al 0.5 % fue preparada disolviendo 1 g. de TB en 200 ml de PBS en caliente. La solución luego es colocada a temperatura ambiente, filtrada y colocada en hielo para su uso inmediato. La temperatura de la solución de TB fue de 10-12 ° C al momento de la perfusión. Las ratas fueron anestesiadas con etil uretano (1mg/kg) y perfundidas en forma transcardíaca con 200 ml de la solución de TB; seguido de una solución de paraformaldehído enfriada en hielo (2% en PBS). El rango de flujo del perfusado es mantenido en 25 ml/min. Los cerebros fueron disecados y fijados toda la noche con sucrosa al 30 %. Subsecuentemente los cerebros fueron guardados a -80 °C hasta el momento de ser procesados para estudios de microscopia de luz. Fueron obtenidos cortes de cerebro en secciones de 300 micrones utilizando un criostato de acuerdo con Paxinos y Watson (12). Los cortes de hipocampo fueron evaluados por microscopia de luz y expresados como positivo (+) y negativo (-) para la coloración con TB. La coloración de la eminencia media y el plexo coroideo fueron utilizados como controles de perfusión adecuada de TB. Este método fue adaptado del usado por Ikeda et al (13).

Test de Evans Blue

El colorante Evans blue (EB, Sigma Chemical Co. St. Louis MO. USA.) al 25 % en NaCl al 0.9%, fue intravenosamente inyectado (25 mg/kg) en ratas anestesiadas con éter. Una hora luego de la inyección del colorante, los animales fueron sacrificados por decapitación. Los cerebros fueron disecados, pesados y colocados individualmente en una solución de formaldehído (2mL/cerebro). Las muestras fueron guardadas a 37°C por 48 h. El contenido de colorante extraído por cada cerebro fue determinado espectrofotométricamente (Photometer 4010, Boehringer) a 620 nm y calculado utilizando una curva de calibración, realizada con diluciones seriadas de EB al 25 % en NaCl al 0.9% (13;14).

• ***Determinaciones de Laboratorio***

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la aorta abdominal para la determinación de parámetros bioquímicos en los 3 modelos experimentales. Se midió la actividad enzimática de la Alanino aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FAL) y Albumina. Los parámetros bioquímicos fueron determinados utilizando kits Roche (Alemania). En LCR se determinaron proteínas totales y glucosa. La concentración de amonio plasmático fue determinado utilizando un Kit de determinación enzimática de amonio UV (Biomérieux, France).

RESULTADOS

1- Hipertensión portal prehepática

Presión Portal

Presión portal medida a los 14 días en ambos grupos, mostro un valor de 7.6 ± 1.90 ($n=6$) en el grupo control y 14 ± 1.80 ($n=6$) en el grupo de ratas hipertensas portales. La diferencia entre ambos grupos fue significativa, ($P < 0.001$).

Perfusión transcardíaca de Trypan Blue

Se observo la presencia del colorante TB en áreas vasculares de los cortes de cerebro de las ratas hipertensas portales, siendo el test positivo. El test fue negativo en las ratas del grupo control.

Test de Evans Blue

La inyección sistémica del colorante EB confirma cuantitativamente los resultados obtenidos en el test anterior. Los resultados son expresados en $\mu\text{g/g}$ de tejido cerebral, y fueron de 6.170 ± 0.380 para el grupo control ($n=12$) y 8.680 ± 0.700 para el grupo de ratas hipertensas portales ($n=9$). La comparación estadística mostro que la diferencia es significativa entre ambos grupos, ($P < 0.01$).

Determinaciones de Laboratorio

El grupo de ratas hipertensas portales mostro un nivel de amonio plasmático de 79.00 ± 15.00 $\mu\text{m/L}$ ($n=8$) y de 12.99 ± 3.94 $\mu\text{m/L}$ para el grupo control ($n=5$). La diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa, ($P < 0.001$).

La actividad plasmática de ALT y AST fue de 63.00 ± 9.00 IU/L y 316.0 ± 23.0 IU/L para el grupo de ratas hipertensas portales ($n=6$) y de 39.00 ± 4.00 IU/L y 155.0 ± 25.0 IU/L para el grupo control ($n=6$) respectivamente, ($P < 0.001$).

2-Intoxicación por MCT

Presión Portal

Se observo un aumento significativo en el valor de presión portal, para grupo tratado con MCT el valor fue de $12,1 \pm 1,0$ mmHg y para el grupo control fue de $7,6 \pm 0,2$ mmHg, ($p < 0,01$).

Perfusión transcárdica de Trypan Blue

Se observo la presencia del colorante TB en la región del hipocampo, limitada por el área vascular, siendo el test positivo para este grupo. El test fue negativo en las ratas del grupo control.

Test de Evans Blue

Para el grupo tratado con MCT el valor de EB fue de $8,34 \pm 0,25$ $\mu\text{g/g}$ de tejido cerebral ($n=8$) y de $6,12 \pm 0,27$ $\mu\text{g/g}$ de tejido cerebral ($n=8$) para el grupo control. La diferencia fue estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p < 0,001$.

Determinaciones de Laboratorio

Un aumento significativo en los valores de actividad de las enzimas hepáticas (AST, ALT) fue observado y una disminución también significativa en la concentración de albumina plasmática entre los grupos de ratas tratadas con MCT y el grupo control ($p < 0,05$).

3- Ligadura del conducto biliar común de rata

Presión Portal

Un aumento significativo en la presión portal fue observado en el grupo de ratas ligadas A $12,3 \pm 1,0$ mmHg con respecto al grupo control $7,8 \pm 0,2$ mmHg, ($p < 0,01$).

Perfusión transcárdica de Trypan Blue

En el grupo de ratas ligadas se observo la presencia del colorante TB en cortes de cerebro, considerándose el test positivo, no así en el caso del grupo control (test negativo).

Test de Evans Blue

El tejido cerebral del grupo de ratas ligadas presento una concentración de EB de $8,71 \pm 0,51$ $\mu\text{g/g}$ de tejido cerebral siendo el valor para el grupo control de $5,90 \pm 0,25$ $\mu\text{g/g}$ de tejido cerebral. La diferencia fue estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p < 0,05$.

Determinaciones de Laboratorio

El grupo de ratas ligadas mostro un nivel de amonio plasmático $0,51 \pm 0,08$ mg/dl ($n=8$) y de $0,24 \pm 0,06$ mg/dl ($n=8$; $P < 0,05$) para el grupo control

La actividad plasmática de ALT y AST fue de 66 ± 7 IU/L y 342 ± 75 IU/L para el grupo de ratas colédoco ligadas y de 41 ± 4 IU/L y 152 ± 27 IU/L para el grupo control respectivamente. El valor de actividad de la FAL para el grupo de ratas ligadas fue de 835 ± 98 IU/L y de 461 ± 24 IU/L para el grupo control.

DISCUSIÓN

Entre las consideraciones farmacológicas que deben tenerse en cuenta al prescribir una medicina, debe considerarse que determinadas patologías traen diferentes consecuencias a nivel del SNC, inclusive el posible pasaje de dicha medicina a través de la BHE, pudiendo producir efectos indeseados.

Se presentan en este trabajo 3 modelos experimentales en ratas: 1- *Hipertensión portal prehepática* por estrechez reglada de la vena porta, con hígado relativamente sano (14 días); 2- *Intoxicación por MCT*, con efecto toxico sobre hígado, pulmón, riñón y cerebro entre otros tejidos. La MCT produce alteración tisular mediante un proceso lento y creciente (44 días) y 3- *Ligadura del conducto biliar común de rata*, modelo de colestasis experimental con ictericia, coluria y acolia y aparición de fibrosis y cirrosis hepática (21 días).

En el primer grupo, hipertensión portal prehepática se presentó con el hígado sano y los otros dos con alteración franca del tejido hepático.

Las tres patologías experimentales tuvieron en común el incremento de la presión portal y la presencia de un aumento del amonio plasmático. Los 3 grupos mostraron un pasaje aumentado a través de la barrera hematoencefálica a los colorantes, EB y TB, no así los controles sanos.

Esto sugiere que estas 3 entidades presentaron la permeabilidad aumentada de la BHE a ciertas moléculas, la presencia de hipertensión portal, el aumento de amonio sanguíneo y modificaciones de parámetros bioquímicos del LCR.

De manera interesante, Eizayaga et al. remarcaron que el aumento de la presión portal es decisivo para la permeabilidad de la barrera: la supresión espontánea de la presión portal a los 40 días, reestablece el pasaje normal de determinadas moléculas por la BHE.

Debe recordarse que en la colestasis, además del aumento de la bilirrubina plasmática (en nuestras ratas tiñe los tejidos y el cerebro de amarillo) se incrementan las sales biliares liposolubles e hidrosolubles, conjugadas o no, lo que agrega un factor más de toxicidad sobre el cerebro y otros tejidos (15).

El amonio tiene un conocido efecto tóxico a nivel cerebral, factor decisivo en el desarrollo de la encefalopatía hepática, puesto que produce alteraciones metabólicas en neuronas y glía (16).

Existe sobrada evidencia de la presencia del síndrome de estrés oxidativo en estos 3 modelos experimentales, en especial en los dos últimos (17). Resulta claro que los tres producen modificaciones en la función cerebral, incluyendo la BHE, alterando la homeostasis del tejido.

Hemos descrito alteraciones en la permeabilidad de la BHE en modelos animales de diversas patologías hepáticas, tanto cirróticas como no cirróticas. Consideramos que este trabajo constituye un alerta a la prescripción de fármacos que puedan producir efectos nocivos sobre el cerebro ante una permeabilidad aumentada de la BHE en pacientes con diversas hepatopatías. Debería continuarse esta línea de investigación tanto en animales como en humanos, debido a la relevancia del tema y a la relativa escasez de conocimiento, especialmente en hepatopatías no cirróticas.

REFERENCIAS

- (1) Li JY, Boado RJ, Pardridge WM. Cloned blood-brain barrier adenosine transporter is identical to the rat concentrative Na⁺ nucleoside cotransporter CNT2. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21(8):929-936.
- (2) Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 1995; 9(10):910-918.
- (3) Eizayaga F, Scorticati C, Prestifilippo JP, Romay S, Fernandez MA, Castro JL et al. Altered blood-brain barrier permeability in rats with prehepatic portal hypertension turns to normal when portal pressure is lowered. *World J Gastroenterol* 2006; 12(9):1367-1372.
- (4) Lemberg A, Calabrese G, Majowicz M, Peredo H, Scorticati C, Filinger E et al. Prostanoid production in endothelial and Kupffer liver cells from monocrotaline intoxicated rats. *Hum Exp Toxicol* 1998; 17(10):564-569.
- (5) Lemberg A, Eizayaga FX, Vatta M, Dominguez A, Romay S, Bianciotti LG et al. Prehepatic portal hypertension in rats modifies norepinephrine metabolism in hypothalamus, medulla oblongata and portal vein. *Dig Dis Sci* 1993; 38(7):1259-1262.
- (6) Lemberg A, Rubio M, Bengochea L, Romay S, Eizayaga F, Diez A et al. Tyrosine hydroxylase activity in discrete brain regions from prehepatic portal hypertensive rats. *Hepatogastroenterology* 1998; 45(20):547-550.
- (7) Lemberg A, Perazzo J, Romay S, Eizayaga F, Vatta M, Rodriguez-Fermepin M et al. Norepinephrine uptake is enhanced in discrete telencephalic and diencephalic areas and nuclei in prehepatic portal hypertensive rats. *Brain Res Bull* 1998; 45(2):153-156.
- (8) Scorticati C, Prestifilippo JP, Eizayaga FX, Castro JL, Romay S, Fernandez MA et al. Hyperammonemia, brain edema and blood-brain barrier alterations in prehepatic portal hypertensive rats and paracetamol intoxication. *World J Gastroenterol* 2004; 10(9):1321-1324.
- (9) Perazzo J, Eizayaga F, Romay S, Bengochea L, Pavese A, Lemberg A. An experimental model of liver damage and portal hypertension induced by a single dose of monocrotaline. *Hepatogastroenterology* 1999; 46(25):432-435.
- (10) Chojkier M, Groszmann RJ. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981; 240(5):G371-G375.
- (11) Marmarou A, Poll W, Shulman K, Bhagavan H. A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J Neurosurg* 1978; 49(4):530-537.
- (12) Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 1980; 3(2):129-149.
- (13) Ikeda Y, Wang M, Nakazawa S. Simple quantitative evaluation of blood-brain barrier disruption in vasogenic brain edema. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1994; 60:119-120.
- (14) Ohtsuki S. New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(10):1489-1496.
- (15) Ljubuncic P, Tanne Z, Bomzon A. Ursodeoxycholic acid suppresses extent of lipid peroxidation in diseased liver in experimental cholestatic liver disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45(10):1921-1928.
- (16) Lemberg A, Fernandez MA. Hepatic encephalopathy, ammonia, glutamate, glutamine and oxidative stress. *Ann Hepatol* 2009; 8(2):95-102.
- (17) Ljubuncic P, Tanne Z, Bomzon A. Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease. *Gut* 2000; 47(5):710-716.