

Apertura reversible de la barrera hematoencefálica inducida por hipercapnia en hiperbilirrubinemia experimental

F. Domínguez Ortega, G. González Azpeitia, M. Cidrás Pidre, J. Calvo Rosales

Resumen. La presencia de encefalopatía bilirrubínica en neonatos gravemente enfermos con bajas tasas de bilirrubina sérica, sigue suscitando el interés por aquellos factores que modifican la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, permitiendo el paso de macrocomplejos bilirrubina-albúmina.

Sin modificación en la afinidad bilirrubina-albúmina, en el presente trabajo intentamos demostrar como el incremento del flujo cerebral desarrollado por la hipercapnia a dos niveles (PCO_2 67,1 y 101,9 mmHg), con descenso del pH (7,00 y 6,93), es capaz de incrementar el depósito cerebral de bilirrubina (control $2,43 \pm 0,54$ mg/g versus $3,29 \pm 0,43$ y $3,28 \pm 1,07$, $F=4,80$, $p < 0,05$) y albúmina I^{125} (control $256,1 \pm 95,8$ μ g/g versus $364,4 \pm 156,1$ y $430,8 \pm 122,4$, $F=3,34$, $p < 0,05$).

An Esp Pediatr 1997;46:374-377.

Palabras clave: Ictericia; Kernicterus; Barrera hematoencefálica; Hipercapnia; Acidosis respiratoria.

HYPERCAPNIA INDUCED REVERSIBLE OPENING OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER IN EXPERIMENTAL HYPERBILIRUBINEMIA

Abstract. Objective: The incidence of bilirubin encephalopathy in extremely ill neonates with low serum bilirubin is stimulating interest in factors that can modify the blood-brain barrier permeability and allow the passage of bilirubin-albumin macrocomplexes, which may be produced by hypercapnia.

Materials and methods: Without modifying the normal bilirubin-albumin affinity, we increased cerebral flow by two levels of hypercapnia (PCO_2 67.1 and 101.9 mmHg), acquired by inhalation of CO_2 enriched air (5 and 15%) and a decrease in pH (7.00 and 6.93).

Results: We demonstrate an increment in cerebral bilirubin deposition (control 2.43 ± 0.54 mg/g versus 3.29 ± 0.43 and 3.28 ± 1.07 , $F = 4.80$, $p < 0.05$) and I^{125} albumin (control 26.1 ± 95.8 μ g/g versus 364.4 ± 156.1 and 430.8 ± 122.4 , $F 0 3.34$, $p < 0.05$).

Key words: Jaundice. Kernicterus. Blood-brain barrier. Hypercapnia. Respiratory acidosis.

Introducción

La ictericia neonatal, a pesar de ser un clásico en la patología del recién nacido, sigue suscitando el interés de los neonatólogos, tanto por su manejo como por el desconocimiento de los hechos usuales que motivan su aparición sin isoimmunización u otras patologías añadidas⁽¹⁻⁵⁾.

Cada vez conocemos más fármacos, o combinaciones de los mismos, que son capaces de antagonizar con la bilirrubina por sus locus de unión a la molécula de albúmina⁽⁶⁻⁸⁾, engrosando la lista iniciada por Silverman en 1956⁽⁹⁾. No obstante, la incidencia real del kernicterus en las unidades de cuidados intensivos neonatales está disminuyendo a expensas de conformar un conjunto de déficits neurosensoriales encuadrables en lo que se podría llamar encefalopatía bilirrubínica, dado que la toxicidad neurológica ejercida por la bilirrubina es capaz de generar cambios en los potenciales evocados de tronco, sin evidencia de daño citológico, como demuestra la estabilidad de las enolasas específicas neuronales en LCR⁽¹⁰⁾.

Este concepto de encefalopatía cobra mayor interés cuando se demuestra que la respuesta a potenciales evocados en neonatos ictericos es influenciada negativamente por las concentraciones séricas de bilirrubina libre⁽¹¹⁾, siendo ésta capaz de generar un descenso en el consumo cerebral de glucosa por bloqueo oxidativo⁽¹²⁾.

La modificación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica permite el paso a su través de macrocomplejos bilirrubina-albúmina, por lo que la deposición cerebral de bilirrubina no precisa el incremento de las concentraciones de bilirrubina libre, tal como demostramos en el caso de la hiperosmolaridad⁽¹³⁾, por lo que contrastamos los efectos de la hipercapnia.

Material y método

Para el experimento empleamos ratas Sprague-Dawley adultas con un peso de $381,2 \pm 44,6$ g. Tras su anestesia con ketamina intraperitoneal a 60 mg/kg, se canalizó la vena yugular externa, administrándose un bolo de 5 μ Ci de albúmina I^{125} (SORIN BIOMEDICA), tras lo cual se perfundió durante 180 minutos una solución de bilirrubina a 30 mg/kg/hora. La bilirrubina cristalina (SIGMA) se disuelve en un tampón descrito por Burgess⁽¹⁴⁾, tamponándose a pH 7,4 y protegiéndose de la luz solar con papel de aluminio.

Departamento de Pediatría. Hospital Materno-Infantil. Las Palmas. Facultad de Medicina. Universidad de Las Palmas.

Correspondencia: Dr. Francisco Domínguez Ortega. Departamento de Pediatría. Secretaría 3ª Planta. Hospital Materno-infantil. Avenida Marítima s/n. 35016 Las Palmas.

Recibido: Marzo 1996

Aceptado: Noviembre 1996

Tabla I Valores iniciales y finales de cada uno de los parámetros distribuidos por grupos

Parámetro	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Bilirrubina total (mg/dl)	3,15±2,29	3,11±1,49	4,48±3,04
Albúmina (g/dl)	3,00±0,68	3,20±0,42	3,28±0,28
CRUA (%)	73,9±13,2	86,1±31,7	95,7±19,6
CRUA/Albúmina	25,7±13,2	26,6±9,06	29,3±6,57
Volumen plasmático (ml)	18,7±2,70	19,2±2,81	17,2±2,15
Bilirrubina circulante (mg)	0,56±0,36	0,59±0,29	0,74±0,45
Albúmina circulante (mg)	0,56±0,15	0,61±0,13	0,56±0,05
Osmolalidad (mOsm/kg)	315,0±11,0	308,9±12,0	312,7±4,11
pH	7,23±0,05	7,00±0,16	6,93±0,06
PCO ₂	38,3±6,39	67,1±17,7	101,9±13,0
PO ₂	46,3±25,0	58,5±15,4	59,5±27,0
HCO ₃	15,8±2,63	16,2±4,67	20,3±1,60
EB	10,7±3,27	15,1±6,51	12,9±3,76
TCO ₂	16,9±2,76	18,2±4,89	44,2±6,28
Saturación (%)	60,6±29,2	67,5±18,9	61,9±17,0
Bilirrubina cerebral (mg/g)	2,43±0,60	3,29±1,10	3,28±1,07
Albúmina I ¹²⁵ cerebral (µg/g)	256,1±95,8	364,4±156,1	430,8±122,4

Seguidamente, se generó una acidosis respiratoria mediante la inhalación en campana de metacrilato de una atmósfera enriquecida con CO₂ al 5% (10 LPM) (grupo 2) y 15% (5 LPM) (grupo 3). Mientras, el grupo control (grupo 1), respiró aire ambiente.

A los 60 minutos de finalizar la perfusión de bilirrubina se obtiene una muestra de sangre y se sacrifica al animal mediante la inyección de 0,5 cc de solución saturada de CIK.

La contaminación del parénquima cerebral por restos de sangre del árbol vascular cerebral, se evitó mediante el lavado con 45 cc de suero salino a través de un catéter en aorta torácica, con ligadura de aorta ascendente. Tras la extracción del cerebro se procedió al homogeneizado por corte.

La evaluación de la capacidad de reserva de unión de la albúmina (CRUA) se verificó mediante la técnica del ácido 2-(4-hidroxibenzeneazo) benzóico (HBABA)⁽¹⁵⁾. La bilirrubina sérica se cuantificó mediante la técnica del dimetil-sulfóxido (SIGMA) y la albúmina mediante el test del verde de bromocresol (SIGMA).

Utilizamos un espectrofotómetro de doble haz Uvikón 810-P controlado por ordenador, para todos los estudios colorimétricos y enzimáticos. El equilibrio ácido-base se realizó con un equipo Radiometer-Copenhagen ABL2, mientras que el centelleo se hizo con un contador gamma Beckmann 4000. Para la medida de la osmolaridad sérica empleamos la técnica crioscópica, con un osmómetro Advanced Instruments 3W.

La extracción cerebral de bilirrubina requirió una modificación de la técnica de Levine⁽¹⁶⁾, empleando la misma solución 2:1 de cloroformo y metanol, conteniendo 5 mg/ml de bromuro de hexadecil-trimetil amonio, con tomas de absorbancia a 454

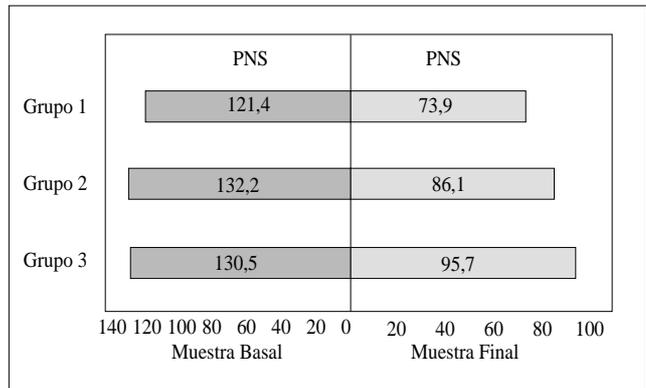


Figura 1. Aunque la CRUA final disminuyó, con respecto al control inicial, a expensas de la saturación de la albúmina por la perfusión de bilirrubina, los valores finales no se influenciaron significativamente por el entorno acidótico (PNS: probabilidad no significativa).

y 580 nm, para una absortividad molar de la bilirrubina en el solvente de 57.400.

El cálculo de la concentración cerebral de albúmina se hizo en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Albúmina cerebral } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Contaje homogeneizado (cpm)}}{\text{Peso hemisferio (g)} \times \text{Actividad específica estándar (cpm}/\mu\text{g})}$$

El estudio estadístico se desarrolló en un diseño para el análisis de la varianza, con los tests de discriminación de Newman-Keuls y Scheffé, así como el coeficiente de correlación lineal de Pearson.

Resultados

La distribución propuesta mostró su homogeneidad con respecto tanto al peso de los animales como con los parámetros bioquímicos estudiados al comienzo del experimento.

En la tabla I podemos observar la totalidad de los resultados obtenidos, tanto en la muestra inicial como en la final. La inducción de la hiperbilirrubinemia se obtuvo con éxito en todos los grupos sin diferencias entre ellos.

La CRUA en la muestra final no mostró diferencias intergrupos, tanto en valores absolutos como corregidos por las tasas séricas de albúmina, lo que demuestra la ausencia de influencia del pH del medio sobre la afinidad de la albúmina por la bilirrubina (Fig. 1). El descenso final de la CRUA con respecto a los valores basales en el grupo control (121,4% versus 73,9%), lo atribuimos a que la perfusión de bilirrubina conlleva la consiguiente saturación de los locus de unión a la albúmina, así como al efecto dilucional del volumen administrado en dicha perfusión.

El tamponamiento de las soluciones perfundidas mantuvo el equilibrio ácido-base sin diferencias con respecto al control basal en el grupo 1, por lo que los cambios objetivados en los grupos 2 y 3 al final de la experiencia se deben, exclusivamente, a

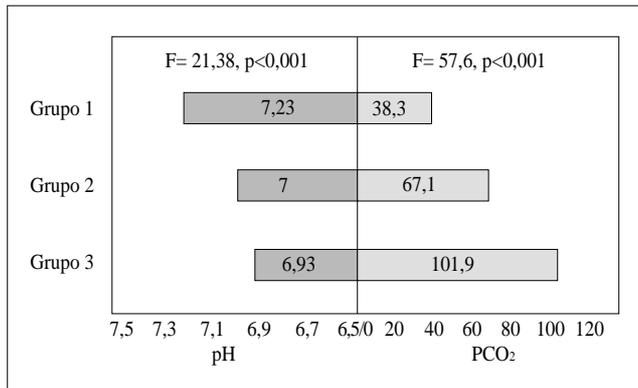


Figura 2. La atmósfera enriquecida con CO₂ indujo eficazmente la hipercapnia, con dos niveles netamente separados, los que trajo la consiguiente reducción del pH.

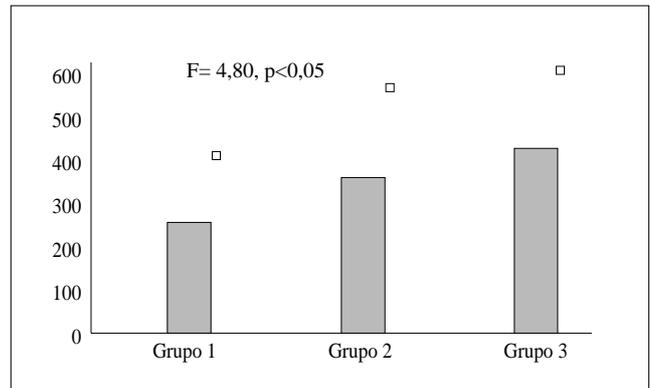


Figura 3. El contaje de albúmina I¹²⁵ cerebral objetivó un mayor depósito de la misma en el parénquima cerebral de los animales sometidos a hipercapnia.

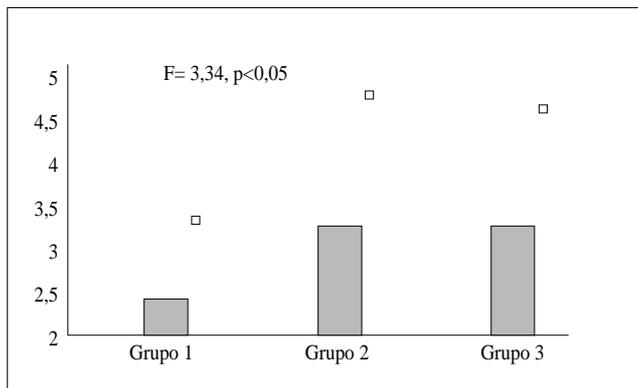


Figura 4. Al igual que con la albúmina, la bilirrubina extraída de parénquima cerebral de los grupos con acidosis respiratoria fue superior a la obtenida en el grupo control.

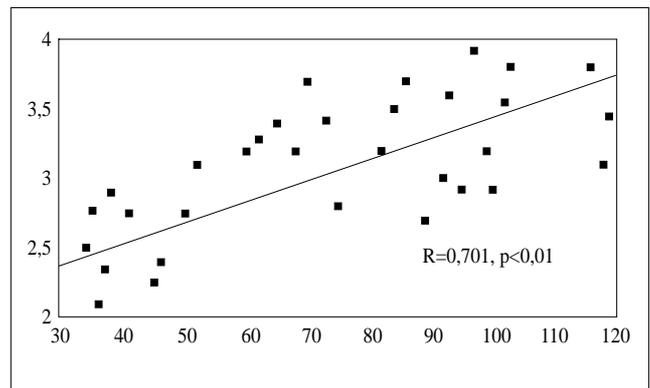


Figura 5. Los cambios en la concentración cerebral de bilirrubina mantuvieron una linealidad con las modificaciones de la PCO₂ sérica.

la atmósfera hipercápnic, con diferencias apreciables en pH ($F=21,38$; $p<0,001$) y PCO₂ ($F=57,76$; $p<0,001$) en los 2 niveles con respecto al control (Fig. 2).

Los grupos sometidos a acidosis respiratoria evidenciaron una mayor concentración cerebral de albúmina ($F=4,80$; $p<0,05$) (Fig. 3), sucediendo de igual forma con la bilirrubina cerebral ($F=3,34$; $p<0,05$) (Fig. 4).

Sin diferencias en la CRUA, el paso de bilirrubina a parénquima cerebral era de esperar que fuera acompañando a moléculas de albúmina, correlacionándose los cambios en la concentración de bilirrubina cerebral con las modificaciones en la PCO₂ sérica ($R=0,701$; $p<0,01$) (Fig. 5).

Discusión

De igual forma que la hiperosmolaridad, por cambios en el flujo cerebral, puede modificar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica⁽¹³⁾, la vasodilatación cerebral producida por la hipercapnia eleva la presión hidrostática y puede producir el paso de macrocomplejos bilirrubina-albúmina, desencadenando un kernicterus con concentraciones relativamente bajas de bi-

lirrubina sérica, algo similar a lo que pasa con la hipertensión arterial⁽¹⁷⁻²³⁾.

Evidentemente, la generación de un medio acidótico puede suponer una modificación de la afinidad de la albúmina por la bilirrubina⁽²⁴⁾, no obstante, la ausencia de diferencias entre la CRUA del grupo control y los grupos problema deja sin dudas la inexistencia de concentraciones significativas de bilirrubina libre.

Si en la línea de la hipótesis planteada por Rapoport^(25,26), un incremento de la presión hidrostática mediante la distensión de las “tight junctions” secundaria al incremento del diámetro capilar, nuestros resultados, tanto en hiperosmolaridad⁽¹³⁾ como en hipercapnia, con estabilidad de los volúmenes plasmáticos, nos siguen haciendo partícipes de la teoría de Farrel y Shivers, para los cuales, la ruptura de la barrera hematoencefálica radica en la formación de canales transendoteliales⁽²⁷⁾.

Los valores de bilirrubina cerebral obtenidos, son similares a los de Bratlid y cols.⁽²⁸⁾, quien para un solo nivel de hipercapnia, equiparable a los de nuestro grupo 3: $3,01 \pm 0,36$ versus $3,28 \pm 1,07 \mu\text{g/g}$ en nuestros resultados. El ensayo a 2 niveles nos precisó la correlación existente entre incremento de la PCO₂

y la deposición cerebral de bilirrubina. La ausencia de correlación entre la albúmina cerebral y el pH/PCO₂ puede venir dada porque añadimos albúmina a la solución de bilirrubina perfundida. Por otra parte, del método seguido por Bratlid, no se deduce que se haya tamponado la solución de bilirrubina, con lo que el pH final de la misma estaría sobre 8, hecho que disminuiría la solubilidad de la bilirrubina incrementando su forma libre, que difunde fácilmente por las membranas lipídicas de los endotelios vasculares cerebrales, dando una desproporción de los cocientes bilirrubina-albúmina en cerebro.

Otro hecho a tomar en consideración es que la hipercapnia produce una hiperventilación, que nos desencadena un cierto grado de hiperoxia, pero los resultados de Hansen y cols.⁽²⁹⁾, nos dejan claro que la presencia de radicales libres (sistema hipoxantina/xantina oxidasa), es incapaz de mediar en la deposición cerebral de bilirrubina.

Desde el punto de vista clínico, aunque sabemos por investigación experimental, que la asfixia es capaz de mediar en apertura reversible de la barrera hematoencefálica⁽³⁰⁾, los datos aportados por Ebbesen y Knudsen⁽³¹⁾, demuestran el mayor riesgo de kernicterus de los neonatos asfícticos, aunque estos autores orientan la causa a la disminución de la CRUA.

Bibliografía

- 1 Cronin CM, Brown DR, Ahdab-Barmada M. Risk factors associated with kernicterus the newborn infant: importance of benzyl alcohol exposure. *Am J Perinatol* 1991; **8**:80-85.
- 2 Gartner LM, Catz CS, Yaffe SJ. Neonatal bilirubin workshop. *Pediatrics* 1994; **94**:537-540.
- 3 Dennery PA, Rhine WD, Stevenson DK. Neonatal jaundice-what now. *Clin Pediatr (Phila)* 1995; **34**:103-107.
- 4 Eberhard BA, Drew JH. Perhaps vigintiphobia should only apply to infants with Rhesus Erythroblastosis. *J Paediatr Child Health* 1994; **30**:341-344.
- 5 Newman TW, Maisels MJ. Evaluation and treatment of jaundice in the term newborn: a kinder, gentler approach. *Pediatrics* 1992; **89**:809-818.
- 6 Robertson A, Brodersen R. Effect of drug combination on bilirubin-albumin binding. *Dev Pharmacol Ther* 1991; **17**:95-99.
- 7 Robertson A, Karp W, Brodersen R. Bilirubin displacing effect of drugs used in neonatology. *Acta Paediatr Scand* 1991; **80**:1119-1127.
- 8 Chan E. Displacing of bilirubin from albumin by berberine. *Biol Neonate* 1993; **63**:201-208.
- 9 Silverman WA, Andersen DH, Blane WA. A difference in mortality rate and incidence of kernicterus among premature infants allotted to two prophylactic antibacterial regimens. *Pediatrics* 1956; **18**:614.
- 10 Hansen TW, Cashore WJ, Oh W. Changes in piglet auditory brainstem response amplitude without increases in serum or cerebrospinal fluid neuron-specific enolase. *Pediatr Res* 1992; **32**:524-529.
- 11 Funato M, Tamai H, Shimada S, Nakamura H. Vigintiphobia, unbound bilirubin, and auditory brainstem responses. *Pediatrics* 1994; **93**:50-53.
- 12 Roger C, Koziel V, Vert P, Nehlig A. Effect of bilirubin infusion on local cerebral glucose utilization in the immature rat. *Brain Res Dev* 1993; **76**:115-130.
- 13 Domínguez F, Martín M, Ormazábal JC, Rodríguez JC, Doménech E. Aspectos cuantitativos de la apertura osmótica de la barrera hematoencefálica en hiperbilirrubinemia experimental. *An Esp Pediatr* 1993; **39**:493-497.
- 14 Burgess GH, Stonestreet BH, Cashore WJ, Oh W. Brain bilirubin deposition and brain blood flow during acute urea-induced hyperosmolality in newborn piglets. *Pediatr Res* 1985; **19**:537-542.
- 15 Porter EG, Waters WJ. A rapid micromethod for measuring the reserve albumin binding capacity in serum from newborn infants with hyperbilirubinemia. *J Lab & Clin Med* 1966; **67**:660-668.
- 16 Levine RL, Fredericks WR, Rapoport SI. Clearance of bilirubin from rat brain after reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Pediatr Res* 1985; **19**:1040-1043.
- 17 Zylan YZ. Pathophysiology of the opening of the blood-brain barrier and the blood-cerebrospinal fluid barriers in acute hypertension. *Exp Neurol* 1984; **84**:18-28.
- 18 Boismare FR, Hacpille L, Lefrancois JB et al. Long-lasting effects of the opening of the blood-brain barrier on the modifications induced by intracarotid injection of noradrenaline (proceeding). *Br J Pharmacol* 1976; **58**:417.
- 19 Nagy Z, Mathieson G, Huttner I. Opening of the tight junctions in cerebral endothelium. II. Effect of the pressure-pulse induced acute arterial hypertension. *J Comp Neurol* 1979; **185**:579-585.
- 20 Robinson JF, Moody RA. Opening of the blood-spine barrier by hypertension. *Surg Forum* 1979; **30**:452-454.
- 21 Nagy Z, Mathieson G, Huttner I. Blood-brain barrier opening to horseradish peroxidase in acute arterial hypertension. *Acta Neuropathol (Berl)* 1979; **48**:45-53.
- 22 Hardebo JE, Nilsson B. Opening of the blood-brain barrier by acute elevation of intracarotid pressure. *Acta Physiol Scand* 1981; **111**:43-49.
- 23 Rapoport SI. Opening of the blood-brain barrier by acute hypertension. *Exp Neurol* 1976; **52**:467-479.
- 24 Kozuki K, Oh W, Widness J et al. Increase in bilirubin binding to albumin with correction of neonatal acidosis. *Acta Paediatr Scand* 1979; **68**:213-217.
- 25 Rapoport SI, Fredericks W, Ohno K. Quantitative aspects of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am J Physiol* 1980; **238**:R421-R431.
- 26 Rapoport SI, Robinson PJ. Tight-junctional modification as the basis of osmotic opening of the blood-brain barrier. *Ann NY Acad Sci* 1986; **481**:250-257.
- 27 Farel CL, Shivers RR. Capillary junctions of the rat are not affected by osmotic opening of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol (Berl)* 1984; **63**:179-189.
- 28 Bratlid D, Cashore WJ, Oh W. *Pediatrics* (ed. esp.) 1984; **17**:249-252.
- 29 Hansen TW, Poulsen JP, Bratlid D. The effect of hypoxanthine, xanthine oxidase and hyperoxia on the accumulation of bilirubin in albumin in young rat brain. *Early Hum Dev* 1992; **30**:171-177.
- 30 Temesvari P, Henez P, Joo F et al. Modulation of the blood-brain barrier permeability in neonatal cytotoxic brain edema: laboratory and morphological findings obtained on newborn piglets with experimental pneumotorax. *Biol Neonate* 1984; **46**:198-208.
- 31 Ebbesen F, Knudsen A. The possible risk of bilirubin encephalopathy as predicted by plasma parameters in neonates with previous severe asphyxia. *Eur J Pediatr* 1992; **151**:910-912.