

Sondas de perfusión intracerebral in vivo - un nuevo diseño y su evaluación -

Alejandro Bayón 1, 2
Benito Antón 1
Sara Solano 1
Ana María Sierra-Honigmann 2
Montserrat Sordo 2

Palabras clave: neuroquímica in vivo, perfusión intracerebral, sondas intracerebrales, liberación de neurotransmisores

Summary

In spite of recent developments on biophysical methods that picture the workings of the living brain (PET, NMR), the intracerebral perfusion probes still are the only direct means to study neurochemical events *in vivo*. However, the invasive nature of these well established tools and the lesion they produce call for new designs and improvements. We have redesigned the classical concentric push-pull perfusion probe introducing a new geometry at the tip: the inner-push-cannula is shielded within the outer-pull-cannula to avoid contact with and erosion of the tissue; also, in order to increase the diffusion interface between the tissue and perfusing medium, slots are drilled on the shaft of the outer cannula. This slotted probe practically eliminates the lesions due to accidental flow obstructions and bleedings during brain perfusion while keeping the same diffusion exchange efficiency of the classical push-pull cannula. The probe we have built is identical in geometry to the new generation of brain dialysis probes (dialytrodes) and shares most of their advantages in protecting the tissue; however, lacking a dialysis membrane barrier, it allows free access to the brain. These safer and efficient perfusion probes may soon find clinical applications.

Resumen

A pesar del desarrollo reciente de técnicas biofísicas para dar imágenes de las funciones del cerebro en el animal íntegro (v.g. tomografía de emisión de positrones, resonancia magnética nuclear), las sondas de perfusión intracerebral son aún el único medio directo de estudio de los fenómenos neuroquímicos *in vivo*. Sin embargo, estos instrumentos tradicionales de perfusión, por su naturaleza invasiva y la lesión que producen, reclaman nuevos diseños y mejoras. Hemos rediseñado la sonda clásica de perfusión -cánula concéntrica de infusión y extracción- modificando la geometría de su punta: La cánula de infusión se retrajo hacia adentro de la cánula externa (de extracción) para evitar que hiciera contacto directo con el tejido y lo erosionara; además, para aumentar la interfase de difusión entre el tejido y el líquido de perfusión, se perforaron ranuras en el cuerpo de la cánula externa. Esta sonda ranurada elimina prácticamente las lesiones accidentales por obstrucciones al flujo y los sangrados durante la perfusión, pero conserva la misma eficiencia de difusión que se

obtiene con las sondas tradicionales. La sonda que hemos construido es de geometría idéntica a la nueva generación de sondas de diálisis intracerebral y comparte muchas de sus ventajas en cuanto a la protección del tejido. Al carecer de la barrera que establece una membrana de diálisis, permite el libre acceso al tejido cerebral. Estas sondas de perfusión, más seguras y eficientes, pudieran ser aplicadas en la clínica a corto plazo.

Introducción

Debido a las limitaciones de los estudios *in vitro* del tejido nervioso, la neuroquímica ha debido desarrollar técnicas de trabajo *in vivo*, aunque casi siempre indirectas: muy al principio midiendo metabolitos neurales vertidos a los fluidos biológicos (sangre, LCR, etc.) y muy recientemente, administrando marcadores exógenos para ser captados o transformados por el tejido nervioso y luego detectados *in vivo e in situ* por métodos físicos. Con todo, solamente la perfusión intracerebral ha permitido el acceso directo a los fenómenos neuroquímicos *in vivo*. Este lavado de áreas discretas de tejido nervioso por infusión y extracción continuas de un medio fisiológico a través de cánulas y tuberías acopladas a sistemas de bombeo, ha permitido administrar y recoger drogas, neuromensajeros y metabolitos en el animal íntegro y correlacionar las observaciones con su conducta normal o patológica (4).

Sin embargo, las técnicas de perfusión intracerebral tropiezan con las limitaciones que impone la lesión tisular que producen -son técnicas invasivas- (10,16): aunque la introducción de la sonda (cánula) de perfusión es comparable a la de un electrodo, la circulación del líquido puede erosionar y lesionar al tejido nervioso y esto llevar a un mayor daño si a su vez el tejido lesionado obstruye el flujo del medio de perfusión (5). En este trabajo presentamos los principales problemas hidrodinámicos de los sistemas tradicionales de perfusión y, con base en ellos, el diseño de la geometría de una nueva sonda de perfusión. Al validar experimentalmente el uso de esta sonda y compararla con las cánulas tradicionales, destacan sus ventajas y se

1 Unidad de Desarrollo de Técnicas Analíticas para la Investigación en Psiquiatría y Neuroquímica. División de Investigaciones Clínicas, IMP.

2 Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

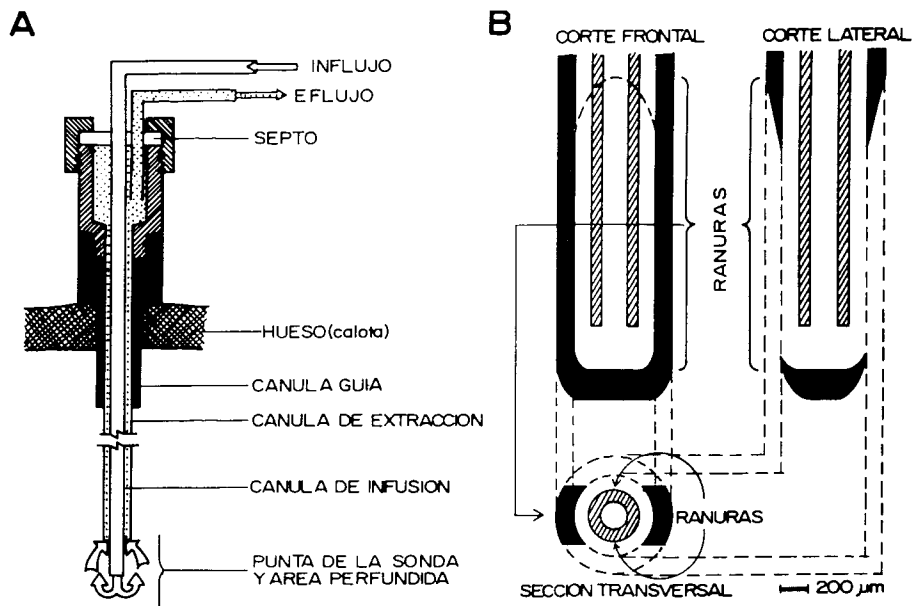


FIGURA 1.- Sonda de perfusión. En A, cánula de infusión-extracción Gaddum-Myers: Los sistemas de infusión (blanco) y extracción (punteado) son concéntricos a lo largo de la sonda y sólo se separan en la cámara superior, construida de dos piezas enroscables (achurado) y un septo plástico. La cánula-guía (negro) incorpora una segunda rosca para aceptar a la sonda. Nótese que en el extremo de la sonda la cánula de infusión protruye de la cánula de extracción. En B, proyección ortogonal de la punta modificada por ranuración. El diseño aparece a escala, mostrando las dos ranuras longitudinales a 180 grados y la obliteración en el extremo de la cánula externa.

muestran semejantes a las de los sistemas de microdiálisis que constituyen la última generación de sondas intracerebrales.

Diseño experimental

Sondas y sistemas de perfusión

El diseño básico de las sondas de perfusión se presenta en la Figura 1A, con un esquema de la doble cánula concéntrica de infusión y extracción ideada por Gaddum (9) y modificada por Myers (12). Esta sonda superó a instrumentos como las copas corticales y las cánulas ventriculares (5, 12), pero introdujo problemas técnicos que hoy se busca resolver: la resistencia que presenta el tejido al flujo del líquido en la punta de la sonda —circulando de la cánula de infusión hacia la cánula de extracción— lleva a que éste se lesione por erosión, sangrado y formación de coágulos, y por el desarrollo de presiones negativas debidas a la succión en el sistema de extracción que puede desprender fragmentos de tejido. Los coágulos y fragmentos tisulares, a su vez, llevan con frecuencia a una mayor obstrucción del flujo, que aumenta la lesión por acumulación de líquido y edema, cerrando un círculo vicioso de daño (5).

El uso de sistemas de perfusión en que no se usa bombeo de extracción (o en que éste se encuentra abierto a la presión atmosférica para tomar aire cuando la resistencia a la extracción del líquido aumenta - Ref. 13, Fig. 2) mejoraron sensiblemente la técnica, pero

no atacaron directamente la causa del problema: el que el tejido se presente como resistencia a la circulación del líquido de perfusión. Este problema depende de la geometría de la sonda de perfusión y sólo se ha abordado tímidamente: retrayendo la cánula de infusión dentro de la cánula de extracción, con la consecuente disminución del área de contacto del líquido de perfusión con el tejido (14, Fig. 2).

Diseño de una sonda ranurada de perfusión.

Partiendo de las experiencias anteriores hemos modificado la geometría de la sonda de perfusión en el extremo que está en contacto con el tejido (Fig. 1B): La sonda prototipo se construyó a partir de tubos de acero inoxidable de pared delgada calibres 21 (externa) y 29 (interna); antes de ensamblarlas, el extremo de la cánula externa se obstruyó con soldadura y se le hicieron, con esmeril y bajo control microscópico, dos ranuras a través de su pared, justo por encima del extremo obliterado. La nueva disposición geométrica de la punta de la sonda hace que la ruta de circulación del líquido de perfusión sea paralela a la superficie expuesta del tejido, con mínima resistencia del mismo y a través del espacio real entre los diámetros de las cánulas externa e interna. El número y la longitud de las ranuras (y así el área de contacto tejido-medio) puede variarse dependiendo de la anatomía y el tamaño del área cerebral que se quiera perfundir. Las primeras pruebas con esta cánula se realizaron perfundiendo el *globus pallidus* de la rata de tamaño medio capaz de captar y liberar marcadores neuroquí-

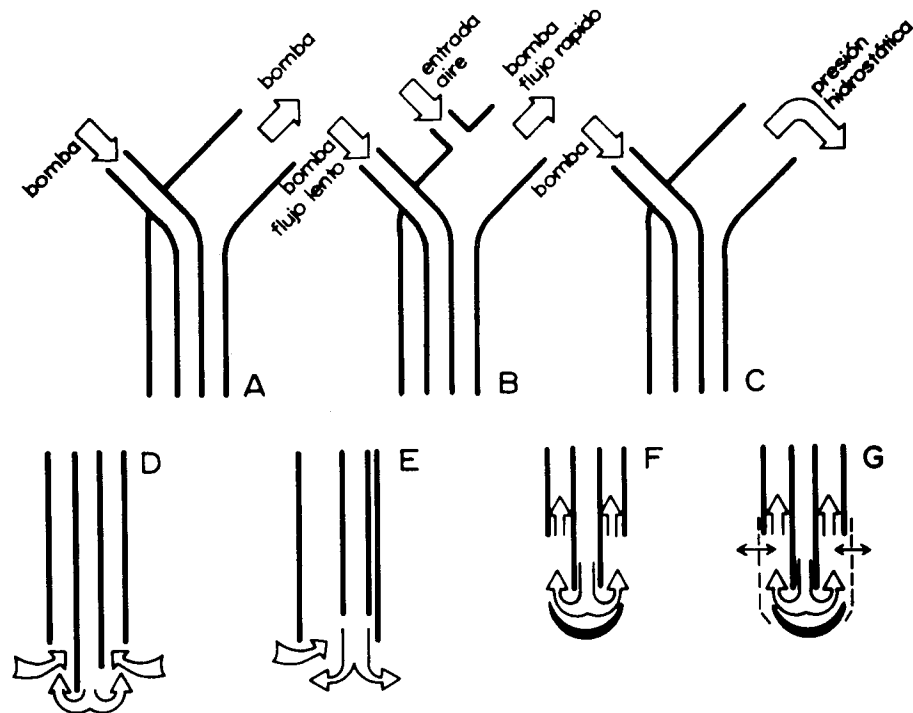


FIGURA 2.— Comparación de distintos sistemas y sondas de perfusión. Sistemas de bombeo: A. sistema cerrado (isovólico). B. sistema abierto a la presión atmosférica (isobárico). C. sistema isobárico -no descrito en el texto-con sólo una bomba de infusión. Sondas de perfusión: D. Cánula de infusión protruyendo de la cánula de extracción (Gaddum). E. Cánula de infusión retraída dentro de la cánula de extracción. F. Sonda ranurada. G. Dialitrodo de nuevo diseño (la línea discontinua indica la membrana de diálisis).

micos representativos, desde aminoácidos y péptidos hasta macromoléculas (2, 3).

Procedimientos de implantación, perfusión y análisis de marcadores químicos

Estas técnicas y sus variantes las hemos descrito con anterioridad (1, 2, 3, 5). Aquí sólo señalaremos que se implantaron crónicamente cánulas "guía" cortas (Fig. 1A) para dirigir la introducción estereotáxica aguda de las sondas de perfusión, al cerebro de animales en libertad de movimiento. Un líquido cefalorraquídeo artificial (que cuando fué necesario contenía GABA tritiado o potasio 50 mM a osmolaridad constante) se infundió y se extrajo del tejido nervioso (25 ó 50 microlitros/min) por medio de bombas peristálticas abiertas a la presión atmosférica (Fig. 2B), conectadas a la sonda por tuberías de plástico. Se colectaron fracciones del efluente —usualmente cada 15 min.— para analizar proteína total (11), lactato deshidrogenasa (7), encefalinas endógenas y GABA tritiado (2, 6).

Comparación y evaluación de la sonda ranurada de perfusión y la sonda clásica de Gaddum

Para evaluar las ventajas y desventajas de la punta ranurada de la sonda de perfusión comparada con el diseño tradicional (Figs. 1A y B, 2 D y F), analizamos en primer lugar la frecuencia de accidentes vasculares

y de obstrucciones al flujo usando una u otra sonda. El sangrado suele ocurrir a consecuencia de la inserción inicial de una sonda, pero durante la perfusión con la cánula tradicional se presentaron, además, sangrados acompañados de obstrucciones parciales al flujo. Esto no ocurrió con la cánula ranurada. Las obstrucciones al flujo, aún sin aparición de sangre, fueron también frecuentes con la cánula de Gaddum (tabla 1) pero ésto sólo ocurrió en una ocasión con el nuevo diseño ranurado. Los sangrados y obstrucciones al flujo fueron siempre acompañados de grandes aumentos fásicos de lactato deshidrogenasa y proteína en los perfusados (marcadores de lesión tisular). Estas lesiones llevaban rutinariamente a la falta de respuesta del tejido a la estimulación (evaluada ésta por la liberación evocada de GABA y encefalinas, dos mensajeros abundantes en el *globus pallidus*).

Ya que la superioridad de la sonda ranurada sobre las cánulas tradicionales es debida a una mejor hidrodinámica y por lo mismo podría traer consigo un ineficiente contacto con el líquido tisular (por un corto circuito dentro de la sonda), fué necesario comparar la difusión tejido/medio en ambas cánulas. Los resultados se muestran en la Tabla 1: en condiciones de reposo el paso de macromoléculas (proteína y lactato deshidrogenasa), mensajeros endógenos (encefalinas) y exógenos (^3H -GABA) del tejido al medio de perfusión fue igual con ambos tipos de sonda. Lo mismo ocurrió con la captura tisular de GABA tritiado añadido

TABLA 1
Comparación de la sonda de Gaddum
y la sonda ranurada

	Sonda de Gaddum	Sonda ranurada
Obstrucciones al flujo y/o sangrados que requirieron interrumpir la perfusión. (a)	7 en 6 perfusiones	1 en 6 perfusiones
Actividad de LDH en perfusados obtenidos en condiciones basales —de reposo (b)	1.5 ± 0.7	1.1 ± 0.6
Proteína en perfusados obtenidos en condiciones basales. (b)	30 ± 12	35 ± 15
Encefalinas liberadas (c)		
—en reposo	15 ± 2	18 ± 4
—por estimulación	29 ± 8	23 ± 3
³ H-GABA. capturado (d)	28 ± 5	29 ± 6
³ H-GABA. liberado (d)		
—en reposo	0.13 ± 0.04	0.16 ± 0.04
—por estimulación	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02

- (a) Serie de 12 sesiones de perfusión (6 horas cada una).
 (b) Los valores de lactato deshidrogenasa (LDH) se expresan en unidades/ml y la proteína en ug/ml de perfusado (X ± EEM; N = 6 sesiones de perfusión).
 (c) Los valores de encefalinas se expresan en unidades (equivalentes a pg de leucina encefalina) liberadas durante periodos de 30 minutos (X ± EEM; N = 6 sesiones).
 (d) El ³H-GABA capturado se expresa en función (%) del ³H-GABA perfundido. El ³H-GABA liberado se expresa en función (%) del ³H-GABA contenido en el tejido estimulado (X ± EEM; N = 6 sesiones).

al líquido de perfusión. También la viabilidad tisular a lo largo de una perfusión —usando como marcadores la liberación evocada de ³H-GABA y encefalinas— fue semejante usando las dos sondas. Así, a pesar de las marcadas diferencias en la frecuencia de lesiones accidentales que se observan con los dos tipos de sonda, en condiciones de reposo (y sin lesión tisular aguda) los marcadores elegidos no muestran diferencias en la eficiencia de las cánulas.

Conclusiones y discusión

En resumen, la sonda ranurada reduce (prácticamente elimina) la incidencia de accidentes vasculares

y oclusiones durante la perfusión intracerebral *in vivo*, manteniendo a un tiempo la misma eficiencia que se obtiene con los diseños tradicionales. Pero para valorar verdaderamente el nuevo diseño debemos clarificar su importancia en el contexto de otras nuevas técnicas de sondeo *in vivo*. En la presente década han aparecido métodos, tales como la voltametría y la amperometría *in situ*, que se presentan como alternativa a la perfusión cerebral. Sin embargo, la introducción de electrodos de óxido-reducción al cerebro sólo permite la detección de un número reducido de sustancias (v.g. aminas biogénicas y algunos péptidos), con especificidad aún cuestionable y con la imposibilidad de colectar y analizar subsecuentemente el material liberado. Esta clase de técnicas, por sus limitaciones de principio, no está destinada a substituir sino a complementar a los métodos de perfusión, ya que la complejidad estereoquímica de muchos mensajeros requiere de técnicas de análisis que hasta ahora se realizan mejor *in vitro* (en el tubo de ensaye) y en el caso de sustancias no caracterizadas químicamente, a través de bioensayos. Por otra parte, las sondas de diálisis intracerebral (dialitrodos), inventadas hace más de quince años (8), han sido rediseñadas recientemente (15) y su uso se extiende de modo creciente. Su nuevo diseño y el de la sonda ranurada coinciden en su geometría, pero se diferencian en que la interfase de difusión libre con el tejido en la sonda ranurada está ocupada en los dialitrodos por una membrana de diálisis (fig. 2 F y G). Ambas sondas minimizan la lesión tisular y previenen los accidentes hidrodinámicos. Sin embargo, la membrana de diálisis puede retener solutos por su tamaño, hidrofobicidad o carga. Esta característica puede ser aprovechable para seleccionar y proteger ciertas sustancias liberables, pero es indeseable cuando no se conocen las características fisicoquímicas de las sustancias o si éstas impiden el paso de las sustancias a través de la membrana. Así, mejoras como la que presentamos a la perfusión intracerebral seguirán siendo puntos de partida para los estudios neuroquímicos *in vivo*: siempre superadas por métodos *ad hoc* al tratar con sustancias neurales conocidas, pero siempre necesarias para la investigación abierta en lo que está por conocerse.

Agradecimientos: Esta investigación se desarrolló como parte del proyecto central de la Sección de Modelos Experimentales de la Unidad IMP-UNAM de Desarrollo Analítico, y ha recibido apoyo financiero por donativos internos del IMP y un donativo del CONACYT (Excelencia) para A.B.

BIBLIOGRAFÍA

1. BAYON A: *In vivo* and *in vitro* studies on peptide release. En: A Boulton, G. Baker, Q Pittman (eds.). *Neuromethods* Vol. 6 "Peptides". Humana Press N Y, 113-142, 1987.
2. BAYON A, ANTON B: Diurnal rhythm of the *in vivo* release of enkephalin from the Globus pallidus of the rat. *Reg Peptides*, 15:63-70, 1986.
3. BAYON A, ANTON B, LEFF P, SOLANO S: Release of proteins, enzymes and the neuroactive peptides, enkephalins, from the striatum of the freely moving rat. *Ann N Y Acad Sci*, 473:401-417, 1986.
4. BAYON A, DRUCKER-COLIN R (Eds.) *In vivo* Perfusion and Release of Neuroactive Substances: Methods and Strategies. Academic Press, Orlando, 1985.
5. BAYON A, DRUCKER-COLIN R: Methodological alternatives and experimental strategies for studying the *in vivo* perfusion and release of neuroactive substances in the

- central nervous system. En: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances*, A Bayón, R Drucker-Colin (eds.), Academic Press, Orlando, 1-7, 1985.
6. BAYON A, SHOEMAKER W J, MCGINTY J F, BLOOM F E: Immunodetection of endorphins and enkephalin: a search for reliability. *Internal Rev Neurobiol*, 24:51-92, 1983.
 7. BERGMEYER H U: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 2. Academic Press, Nueva York, 574-579, 1974.
 8. DELGADO J, DE FEUDIS F, ROTH R, RYUGO D, MITRUKA B: Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn*, 198:9-21, 1972.
 9. GADDUM J H: Push-pull cannulae. *J Physiol*, 155:1-2P, 1961.
 10. HONCHAR M P, HARTMAN B K, SHARPE L G: Evaluation of in vivo brain site perfusion with the push-pull cannula. *Am J Physiol*, 236:R45-56, 1979.
 11. LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, RANDALL R J: Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275, 1951.
 12. MYERS R D: An improved push-pull cannula system for perfusing an isolated region of the brain. *Physiol Behav* 5:243-246, 1970.
 13. NEQUILLON A, CHERAMY A, GLOWINSKI J: An adaptation of the push-pull cannula method to study the in vivo release of (3H)-dopamine synthesized from (3H)-tyrosine in cat caudate nucleus: Effect of various physical and pharmacological treatments. *J Neurochem*, 28:819-828, 1977.
 14. PHILIPPU A, PRZUNTEK H, ROENBERG W: Superfusion of the hypothalamus with gamma-aminobutyric acid: Effect on the release of noradrenaline and blood pressure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 276:103-118, 1973.
 15. UNGERSTEDT U, HERRERA-MARSCHITZ M, JUNGLINS U, STAHL L, TOSSMAN U, ZETTERSTROM T: Dopamine synaptic mechanism reflected in studies combining behavioral recordings and brain dialysis. *Adv Dopamine Res*, 37:219-231, 1982.
 16. YAKSH T L, YAMAMURA H I: Factors affecting performance of the push-pull cannula in brain. *J Appl Physiol*, 37:428-434, 1974.