

**ORIGINALES****Infusión intracerebroventricular de sodio y natriuresis no relacionada con un factor natriurético similar a la ouabaína**

J. DIEZ, M. G. PERNOLLET\* y F. GUARNER.

Departamento de Medicina Interna. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona.

\* INSERM U7. Hospital Necker. París.

**RESUMEN**

Se ha sugerido que un factor natriurético humoral de origen cerebral podría mediar la natriuresis que acompaña al aumento del contenido de sodio del líquido cefalorraquídeo. Por otra parte, se admite que el cerebro podría ser el origen de un factor natriurético con propiedades similares a las de los glicósidos cardiotónicos.

En el presente trabajo hemos investigado la presencia de un factor plasmático capaz de desplazar la ouabaína tritiada fijada a eritrocitos humanos. Se han utilizado plasmas procedentes de ratas control y ratas sometidas a infusión intracerebro-ventricular de líquido cefalorraquídeo normal en sodio, rico en sodio y pobre en sodio.

Las ratas infundidas con mucho sodio excretan significativamente más sodio que las ratas control o las ratas infundidas con sodio normal. Las ratas infundidas con poco sodio presentan una disminución significativa de la natriuresis al compararlas con las ratas control y las ratas infundidas con sodio normal. En los plasmas de los cuatro grupos de ratas se detectó la presencia de un factor capaz de desplazar a la ouabaína tritiada fijada a eritrocitos. No se hallaron diferencias significativas en la cuantía de ese factor en ninguno de los cuatro grupos.

Nuestros hallazgos indican que la respuesta natriurética observada en ratas sometidas a un incremento agudo del contenido de sodio del líquido cefalorraquídeo no parece relacionarse con el aumento de los niveles de un factor circulante con propiedades similares a las de la ouabaína.

**Palabras clave:** Cerebro. Factor natriurético circulante. Natriuresis.

**NATRIURESIS FOLLOWING INTRACEREBROVENTRICULAR INFUSION OF SODIUM IS NOT RELATED TO A OUABAIN-LIKE FACTOR****SUMMARY**

It is well known that intracerebroventricular infusion of sodium enriched cerebrospinal fluid augments renal sodium excretion in several animal species. The mechanism that mediates this natriuresis is unclear, but the natriuretic response requires the anatomic integrity of the anteroventral third ventricle region. Furthermore, it has been postulated that this region may be the source of a natriuretic hormone with properties similar to those of the cardiac glycosides. Therefore, we have investigated the presence of a ouabain-like factor in plasma extracts from phenobarbital anesthetized sham operated rats (group 1), rats submitted to intracerebroventricular infusion of normal sodium cerebrospinal fluid (Na: 150.5 mmol/l.) during two hours (group 2), rats subjected to the infusion of high sodium cerebrospinal fluid (Na: 350 mmol/l.) (group 3) and rats infused with low sodium (Na: 50.5 mmol/l.) (group 4).

To investigate the presence of a ouabain-like factor we have tested the potency of plasma extracts to displace the binding of ouabain to human erythrocytes in the presence of  $2 \times 10^{-9}$  M H<sup>3</sup>-ouabain. This potency was measured as the ouabain

Correspondencia: Dr. Javier Díez.  
Departamento de Medicina Interna.  
Clínica Universitaria. Pío XII, s/n. 31008 Pamplona.  
Recibido: 7-II-1984.  
En forma definitiva: 27-IV-1984.  
Aceptado: 9-V-1984.

binding displacement in the presence of 50  $\mu$ l. of plasma extract. We expressed this measurement as equivalent of ouabain concentration.

As figure 2 shows, group 3 rats excreted significantly larger amounts of sodium than rats from groups 1 and 2. Conversely, group 4 rats urinary sodium was significantly lower than those of groups 1 and 2. Nevertheless, no significant changes between the four groups were found in the measurement of the plasma extracts potency to interfere with ouabain binding (table II).

Our findings indicate that natriuresis in rats submitted to an acute increase in cerebrospinal fluid sodium content is not associated to increased levels of a circulating ouabain-like factor.

**Key words:** Brain. Circulating ouabain-like factor. Natriuresis.

## INTRODUCCION

Diversas evidencias indican que la región anteroventral del tercer ventrículo cerebral (AV3V) es esencial para la producción de ciertos efectos que siguen al incremento agudo de la concentración de Na del líquido cefalorraquídeo (LCR)<sup>4</sup>. Ratas con lesiones electrolíticas de la región AV3V muestran incapacidad para excretar Na básalmente<sup>3</sup> o tras aumentar la concentración de Na del LCR<sup>4</sup>. Esos mismos animales no presentan en su circulación un factor natriurético inhibitor de la bomba de Na cuando son sometidos a una sobrecarga con ClNa<sup>3</sup>. Todo ello sugiere que la región AV3V podría ser el lugar que controla la liberación de dicho factor natriurético<sup>3</sup>. Por otra parte, un mecanismo mediado por un factor natriurético humoral se ha propuesto para explicar la natriuresis que se asocia a la infusión intracerebro-ventricular de LCR rico en Na<sup>5</sup>.

Actualmente se admite que existiría un factor natriurético circulante con propiedades similares a las de los glicósidos cardiotónicos, por ejemplo: desplazar la ouabaina fijada a las membranas celulares<sup>6</sup>. En este trabajo hemos investigado la presencia en el plasma de la rata de un factor con propiedades similares a las de la ouabaina con el fin de evaluar: a) la respuesta de dicho factor a la modificación del contenido de Na del LCR y b) su posible participación en la producción de los cambios de la natriuresis.

## METODOS

### Animales

17 ratas Wistar, 10-12 semanas de edad y 200-250 gr. de peso, fueron arbitrariamente divididas en cuatro grupos: Grupo 1: ratas control, anestesiadas con fenobarbital y operadas pero no infundidas; grupos 2, 3 y 4: ratas sometidas a infusión de LCR. Todas las ratas fueron colocadas en jaulas metabólicas individuales con acceso libre a una dieta estándar y a agua natural durante las 96 horas previas al experimento.

### Infusión de LCR

Los animales de los grupos 2, 3 y 4, previa anestesia con fenobarbital (30-40 mg/kg.) fueron sometidos a infusión de LCR en el ventrículo lateral cerebral (acceso quirúrgico estereotáxico) durante 2 horas y a una velocidad de 8,3  $\mu$ l/min. (bomba de

infusión Travenol 5M117). La correcta colocación de la aguja de microinyección se verificó mediante técnicas histológicas.

Las soluciones de infusión se prepararon de acuerdo con la composición normal del LCR de la rata<sup>7</sup>. En la tabla I se especifica la composición de cada solución. Las ratas del grupo 2 se infundieron con LCR normal en Na; las de los grupos 3 y 4 con LCR rico y pobre en Na, respectivamente.

### Estudios urinarios

Las muestras de orina se obtuvieron por micción espontánea durante el procedimiento quirúrgico y por punción vesical al final del mismo. La concentración de Na se determinó mediante fotometría de llama (fotómetro Beckman, Klina Diluter 270).

### Preparación de extractos plasmáticos

Al finalizar la infusión intracerebroventricular de LCR las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción cardiaca. La sangre se recogió en tubos con heparina y se centrifugó a 3.000 g. durante 5 minutos. Cada plasma se almacenó a  $-20^{\circ}$  C hasta su utilización. Los plasmas se hirvieron durante 15 minutos. La red proteica fue dislocada en fragmentos pequeños y centrifugada a 50.000 g. durante 15 minutos. Los sobrenadantes claros obtenidos se procesaron inmediatamente o se almacenaron a  $-80^{\circ}$  C hasta su análisis definitivo.

### Fijación de la ouabaina tritlada a los eritrocitos

La ouabaina-<sup>3</sup>H (17-32 Ci/mmol.) se obtuvo de Amersham (UK) en una mezcla de benceno y etanol (9/1). Los solventes orgánicos se evaporaron en nitrógeno y el residuo se extrajo en un tampón de trometamol-TRIS-ClH 10 mM, pH 7,4. La fijación de la ouabaina-<sup>3</sup>H se estudió en eritrocitos de sujetos normotensos y sin historia familiar de hipertensión.

Los eritrocitos fueron separados por centrifugación, 3.000 g. durante 5 min., y lavados cinco veces en un medio con la siguiente composición (en mmol/l.): ClNa 130, sacarosa 20, glucosa 10 y trometamol 10. El medio se tamponó a pH 7,4 con ClH. Las células (hematócrito 1-3 %) se incubaron a 37 $^{\circ}$  C durante 5 horas en presencia de concentraciones de ouabaina-<sup>3</sup>H variables entre  $2 \times 10^{-9}$  y  $2,5 \times 10^{-8}$  mol/l. Se efectuaron incubaciones paralelas con adición de un exceso de ouabaina no marcada ( $10^{-4}$  mol/l.) para medir la fijación no saturable. La fijación específica fue considerada como la diferencia entre la fijación de ouabaina-<sup>3</sup>H en ausencia y en presencia de ouabaina no marcada. La radiactividad fijada y la libre se separaron mediante filtración en filtros Whatman GFC. La radiactividad se contó en presencia de Instagel acidificado tras tratamiento con 1 ml. de tolueno 350 (Packard) y 0,5 ml. de peróxido de hidrógeno.

Cada estudio de fijación se realizó utilizando cinco concentraciones de ouabaina y los parámetros de fijación se calcularon a partir de la regresión lineal del test de Scatchard. En estas condiciones la fijación de ouabaina-<sup>3</sup>H a los eritrocitos se equilibró en

5 horas y la fijación no-saturable supuso menos del 20 % de la fijación total. La fijación específica fue saturable y el análisis de Scatchard mostró la presencia de una sola clase de sitios con una constante de disociación aparente de  $2,1 \pm 0,8 \times 10^{-9}$  mol/l. y un número de sitios por célula de  $396 \pm 27$ . Estos valores son similares a los obtenidos por otros laboratorios<sup>8</sup> (Fig. 1).

Se realizaron estudios para valorar las variaciones de la constante de afinidad en presencia de concentraciones de K superiores a 1 mmol/l. Cambios significativos en la afinidad se observaron para concentraciones de K superiores a 0,25 mmol/l. Dado que las concentraciones plasmáticas de K variaron entre 2,5 y 6,5 mmol/l., los extractos plasmáticos se estudiaron a una dilución de 1/30. Se constató asimismo que las concentraciones fisiológicas de  $Ca^{2+}$  no modificaban la fijación de la ouabaína.

**Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Los datos se han analizado estadísticamente mediante el test «t» de Student no emparejado y mediante análisis de regresión lineal.

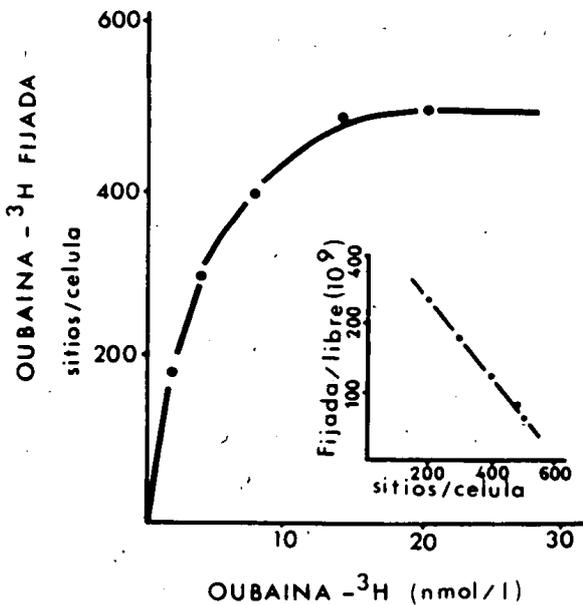


Fig. 1.—Curva de fijación de la ouabaína a los eritrocitos en ausencia de extractos plasmáticos. Los datos se expresan como una función de la concentración de ouabaína. En el gráfico interior se representa el test de Scatchard aplicado a los mismos datos.

**RESULTADOS**

La figura 2 muestra que las ratas del grupo 2 no excretan una cantidad de Na significativamente distinta que

las ratas del grupo 1 ( $0,319 \pm 0,100$  versus  $0,321 \pm 0,040$ ,  $\mu\text{mol}/\text{min}.$ ). Por el contrario, las ratas del grupo 3 excretan significativamente más Na ( $p < 0,001$ ) que las del grupo 2 ( $0,967 \pm 0,292 \mu\text{mol}/\text{min}.$ ). Las ratas del grupo 4 presentan una natriuresis significativamente disminuida ( $p < 0,002$ ) con respecto a las ratas del grupo 2 ( $0,100 \pm 0,050 \mu\text{mol}/\text{min}.$ ).

La figura 3 representa el débito urinario de los distintos grupos de ratas expresado en  $\mu\text{l}/\text{min}.$  No se aprecian cambios significativos entre el grupo 1 y el grupo 2 ( $6,0 \pm 1,0$  versus  $6,0 \pm 2,0$ ). Las ratas del grupo 3 presentan un aumento no significativo del volumen minuto ( $8,0 \pm 2,0$ ), mientras que la diuresis de las ratas del grupo 4 aparece disminuida no significativamente ( $4,0 \pm 2,0$ ).

En la tabla II se recoge la potencia de los diferentes extractos plasmáticos para desplazar la fijación de ouabaína a eritrocitos humanos en presencia de ouabaína-<sup>3</sup>H ( $2 \times 10^{-9}$  M). Dicha potencia se ha medido como el desplazamiento de ouabaína fijada en presencia de 50  $\mu\text{l}.$  de extracto plasmático. Esta medida se expresa como equivalente de la concentración de ouabaína. No se aprecian cambios significativos en la potencia de los extractos plasmáticos de los distintos grupos de animales estudiados.

TABLA II  
MEDIDA DE LA POTENCIA PLASMÁTICA PARA DESPLAZAR LA FIJACION DE OUBAINA-<sup>3</sup>H A ERITROCITOS

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
2,14 $\pm$ 0,57	2,71 $\pm$ 1,41	3,05 $\pm$ 1,61	3,05 $\pm$ 1,34

Los valores se expresan como equivalente de la concentración de ouabaína (rango  $10^{-9}$  M). Todos los valores vienen dados como media  $\pm$  DEM.

Los estudios de regresión lineal no demuestran la existencia de ninguna correlación estadísticamente significativa entre los diferentes parámetros estudiados.

**DISCUSION**

La infusión intracerebro-ventricular de LCR rico en Na aumenta la excreción renal de Na en varias especies

TABLA I  
COMPOSICION DE LAS DIFERENTES SOLUCIONES DE LCR EMPLEADAS EN LAS INFUSIONES INTRACEREBROVENTRICULARES

Grupo de ratas	LCR	Na final	ClNa	ClK	Cl <sub>2</sub> Ca	Cl <sub>2</sub> Mg	CO <sub>3</sub> HNa	PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	Glucosa	Osmolalidad (*)
2	Na normal	150,5	123,5	3	~1,3	0,8	25	1	2,5	280
3	Na rico	350,0	323,0	3	1,3	0,8	25	1	2,5	570
4	Na pobre	50,5	23,5	3	1,3	0,8	25	1	2,5	105

Todos los valores se expresan en mmol/l. (\*) La osmolalidad se expresa en mmol/kg.



esas células<sup>20</sup>. Esos mismos animales presentan alteraciones en la excreción urinaria de prostaglandinas correlacionables con la excreción de Na y con la presencia en el plasma de un factor(es) capaz de interferir el metabolismo del ácido araquidónico<sup>21</sup>. Por lo tanto, parece razonable relacionar el aumento del contenido de Na del LCR con una posible producción hipotalámica de un factor(es) que modifica el metabolismo sistémico y renal de las prostaglandinas y detectable en una situación en la que la excreción de Na aumenta en correlación con los cambios en la excreción de prostaglandinas.

Junto a la hipótesis humoral para explicar la natriuresis consecutiva al aumento del Na del LCR de la rata cabe considerar también la hipótesis neural. Observaciones recientes de BEALER<sup>2</sup> sustentan la hipótesis de que la citada natriuresis podría estar mediada por influencias neurogénicas que inciden sobre la hemodinámica sistémica y sobre la hemodinámica renal. Dichas influencias requieren la integridad de la región AV3V<sup>2</sup>.

En conclusión: Sobre la base de nuestras observaciones puede afirmarse que la respuesta natriurética observada en ratas sometidas a un incremento agudo del contenido de Na del LCR no parece deberse al efecto de un factor natriurético circulante con propiedades similares a las de la ouabaina. Factores circulantes de posible origen hipotalámico capaces de interferir el metabolismo del ácido araquidónico y/o mecanismos neurogénicos centrales podrían estar implicados en la mediación de la citada respuesta natriurética.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BRODY, M. J., y JOHNSON, A. K.: «Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation, and hypertension». En: *Frontiers in neuroendocrinology*, Ed. por L. Martini y W. F. Ganong. Raven, pp. 249-292. New York, 1980.
2. BEALER, S.: «Hemodynamic mechanisms in CNS-induced natriuresis in the conscious rat». *Am. J. Physiol.*, 244: F376-F382, 1983.
3. BEALER, S.; HAYWOOD, J. R.; JOHNSON, A. K.; GRUBER, K. A.; BUCKALEW, V. M., y BRODY, M. J.: «Impaired natriuresis and secretion of natriuretic hormone (NH) in rats with lesions of the anteroventral 3RD ventricle (AV3V) region». *Fed. Proc.*, 38 (3): 1232, 1979.
4. PAMMANI, M.; HUOT, S.; BUGGY, J.; CLOUGH, D., y HADDY, F.: «Demonstration of a humoral inhibitor of the Na, K pump in some

- models of experimental hypertension». *Hypertension*, 3: II 96-II 101, 1981.
5. LEKSELL, L. G.; DENTON, D. A.; FEI, D. T. W.; MC KINLEY, M. J.; MÜLLER, A. F.; WISINGER, R. S., y YOUNG, H.: «On the importance of CSF Na in the regulation of renal sodium excretion and renin release». *Acta Physiol. Scand.*, 115: 141-146, 1982.
6. DE WARDENER, H. E., y CLARKSON, E. M.: «The natriuretic hormone: recent developments». *Clin. Sci.*, 63: 415-420, 1982.
7. ZUCKER, I. H.; LEVINE, N., y KALLEY, G.: «Third ventricular injection of hypertonic NaCl: Effects of renal denervation on natriuresis». *Am. J. Physiol.*, 227: 35-41, 1974.
8. HAMLIN, J. M.; RINGEL, R.; SCHAEFFER, J.; LEVINSON, P. D.; HAMILTON, B. P.; KOWARSKI, A. A., y BLAUSTIN, M. P.: «A circulating inhibitor of Na, K-ATPase associated with essential hypertension». *Nature*, 300: 650-652, 1982.
9. DORN, J., y PORTER, J. C.: «Diencephalic involvement in sodium excretion in the rat». *Endocrinology*, 86: 1112-1117, 1970.
10. MOUW, D. R.; VANDER, A. J.; LAMDIS, C.; KUTSCHINSKI, S.; MATHIAS, N., y ZIMMERMAN, D.: «Dose-response relation of CNS sodium and renal sodium excretion, and its absence in homozygous Brattleboro rats». *Neuroendocrinology*, 30: 206-212, 1980.
11. ANDERSSON, B.; DALLMAN, M. F., y OLSSON, K.: «Evidence for hypothalamic control of renal sodium excretion». *Acta Physiol. Scand.*, 75: 496-510, 1969.
12. DORN, T. B.; LEVINE, N.; KALEY, G., y ROTHBALLER, A. B.: «Natriuresis induced by injection of hypertonic saline into the third cerebral ventricle of dogs». *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131: 240-242, 1969.
13. PASSO, S. S.; THORNBOROUGH, J. R., y ROTHBALLER, A. B.: «Natriuresis following fourth ventricle perfusion with high-sodium artificial CSF». *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 53: 363-367, 1975.
14. HAUPERT, G. T., y SANCHEZ, J. M.: «Sodium transport inhibitor from bovine hypothalamus». *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76:4658-4660, 1979.
15. FISHMAN, M.: «Endogenous digitalis-like activity in mammalian brain». *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76:4661-4663, 1979.
16. LISCHTEIN, D., y SAMUELOV, S.: «Membrane potential changes induced by the ouabain-like compound extracted from mammalian brain». *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 79:1453-1456, 1982.
17. ALAGHBAND-ZADEH, J.; FENTON, S.; MILLET, J.; HANCOCK, K., y DE WARDENER, H. E.: «The effect of sodium intake on the content of a substance in the rat hypothalamus which stimulates glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in vitro». *Clin. Sci.*, 61:43, 1981.
18. KRACKE, G. R.: «Na, K-ATPase inhibitor from guinea pig brain is not ouabain-like». *J. Lab. Clin. Med.*, 101:105-113, 1983.
19. BUCKALEW, V. M., y GRUBER, K. A.: «Natriuretic hormone». En: *The kidney in liver disease*. Ed. por M. Epstein. Elsevier, pp. 479-499. New York, 1983.
20. DIEZ, J.; ERRASTI, P.; VILLARO, J., y PURROY, A.: «Studies on the hypothalamic origin of a natriuretic-pressor substance». *Kidney Int.*, 24:130, 1983.
21. DIEZ, J.; COLINA, I.; GUARNER, F.; QUIROGA, J.; CORZO, J.; PURROY, A., y PRIETO, J.: «Intracerebroventricular infusion of sodium chloride-rich artificial cerebrospinal fluid in rats induces natriuresis and releases an inhibitor of prostaglandin synthesis». *Clin. Sci.*, 66:621-624, 1984.

#### Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a Carmen García Gortari y María Marco por su ayuda técnica.