

Efecto de la α -Metildopa sobre la Neurotransmisión Dopaminérgica Estriatal. Un Estudio mediante la Técnica de Perfusión por Microdiálisis

Javier A.W. OPEZZO *, María R. ALONSO y Carlos A. TAIRA

*Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires, Junín 956
Buenos Aires (1113), Argentina.*

RESUMEN. Se estudió el efecto del inhibidor de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos α -metildopa sobre la neurotransmisión dopaminérgica en el cuerpo estriado de ratas mediante la técnica de perfusión por microdiálisis. La α -metildopa, que a la dosis de 100 mg/kg (i.p.) sólo muestra una acción cardíaca, induce la acumulación de la l-dopa en el cuerpo estriado de ratas, sugiriendo una inhibición de la síntesis de dopamina, pero al mismo tiempo provoca también un incremento de la concentración de dopamina en las muestras de perfusato. Este último efecto podría deberse a alguna acción de la droga sobre la liberación del neurotransmisor.

SUMMARY. "Effect of α -methylDOPA on striatal dopaminergic neurotransmission. A study by using the technique of microdialysis perfusion". The effect of α -methylDOPA, an inhibitor of aromatic aminoacid decarboxilase on dopaminergic neurotransmission, was studied in rat striatum by using the technique of microdialysis perfusion. At a dose (100 mg/kg, i.p.) with only cardiac action, α -MethylDopa induces striatal accumulation of l-dopa, suggesting an inhibition of dopamine synthesis in rat striatum. However, an increase of dopamine level was also seen which could be due by an action of α -methylDOPA on the neurotransmitter release.

La α -metildopa es un agente antihipertensivo conocido desde hace mucho tiempo cuyo efecto se alcanza mediante un mecanismo a nivel del sistema nervioso central, en donde es convertida a α -metilnoradrenalina, un potente agonista α_2 adrenérgico. La α -metilnoradrenalina, actuando en forma similar a la clonidina, sería la mediadora del efecto antihipertensivo central ^{1,2}.

Se sabe que la α -metildopa inhibe la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, enzima que cataliza el paso de l-DOPA en dopamina, siendo éste un efecto notable a nivel central ³. Las acciones de la α -metildopa han sido estudiadas en di-

PALABRAS CLAVE: α -metildopa, Cuerpo estriado, l-DOPA, Dopamina, Perfusión por microdiálisis.

KEY WORDS: α -methylDOPA, Striatum, l-DOPA, Dopamine, Microdialysis perfusion.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: javier@cafarm.ffyb.uba.ar

versas estructuras del sistema nervioso central tales como el hipotálamo, bulbo, el núcleo catecolaminérgico *locus coeruleus*, etc., como así también sus efectos sobre la neurotransmisión noradrenérgica en el núcleo del tracto solitario ⁴.

Con la introducción de la técnica de perfusión intracerebral por microdiálisis es posible realizar un seguimiento temporal de los cambios que pudieran ocurrir en la concentración extracelular de neurotransmisores bajo distintos tratamientos ⁵. Dado que este agente antihipertensivo, α -metildopa, como inhibidor de la decarboxilasa de aminoácidos aromáticos puede alterar la síntesis de la dopamina, el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar los posibles cambios que se registraran en la neurotransmisión dopaminérgica del cuerpo estriado de ratas anestesiadas tras la administración i.p. de este fármaco.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Fueron utilizadas ratas macho de la cepa Wistar (250-300 g). Los animales fueron colocados en jaulas individuales, mantenidos bajo un ciclo de luz de 12 h a una temperatura de 20-22 °C. Cada animal dispuso de alimentos y agua *ad libitum*.

Sondas de microdiálisis

Las sondas se fabricaron en nuestro laboratorio, de acuerdo con la técnica descrita previamente por Giovanni ⁶. Para la fabricación de las mismas, se utilizaron fibras de diálisis de rayon cuproamónico de 10.000 D de permeabilidad y 200 μm de diámetro externo, tubos delgados de sílice de 150 μm de diámetro externo y tubos de acero inoxidable 23G.

Se cortaron segmentos de tubo de acero inoxidable de 28 mm, fibras de diálisis de 6 mm y tubos de sílice de 40 mm de largo. Se introduce el tubo de sílice dentro del tubo de acero, dejando que sobresalga 3 mm aproximadamente por uno de los extremos. Luego se introduce esta porción del tubo de sílice dentro de la fibra de diálisis, la cual deberá ser introducida a su vez dentro del tubo de acero inoxidable. Se cierra el extremo libre de la fibra de microdiálisis y la unión entre ésta y el tubo de acero usando cemento epoxi, cuidando que no se tape el tubo de sílice.

El tubo de acero y el tubo de sílice se conectan a cánulas de polietileno, las cuales servirán para conectar la sonda a una bomba de perfusión y para recolectar el perfusato. En la Figura 1 se muestra un esquema de la sonda utilizada.

Calibración de las sondas de microdiálisis

Cada sonda de microdiálisis se calibró inmediatamente después de realizar el respectivo experimento. Para esto se colocó la sonda en una solución estandar de dopamina (50 ng/ml), α -metildopa (50 ng/ml) y l-dopa (50 ng/ml). Luego se perfundió la sonda con una solución salina de igual composición a la que se utilizó en los experimentos a la misma velocidad (1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$) y recogiendo muestras del perfusato cada 20 minutos. Se descartaron las tres primeras muestras para permitir que transcurra el tiempo necesario para estabilizar el sistema y luego se recogieron seis muestras que posteriormente fueron cuantificadas.

El porcentaje de recuperación se calculó como la relación entre la concentración del estándar y la concentración promedio de las muestras para dopamina, α -metildopa y l-dopa.

Se obtuvo un porcentaje de recuperación de aproximadamente 10% con las sondas utilizadas para dopamina, α -metildopa y l-dopa. Los resultados obtenidos en los experimentos no fueron corregidos por el porcentaje de recuperación.

Cirugía

Los animales fueron anestesiados con una combinación de cloralosa (120 mg/kg, i.p.) y uretano (500 mg/kg, i.p.). Estas dosis permitieron mantener al animal anestesiado durante la extensión total del experimento.

En un primer paso los animales fueron traqueotomizados y luego colocados en un estereotáxico Stoelting para la ubicación de la sonda de microdiálisis en el cuerpo estriado. Se utilizaron las siguientes coordenadas con respecto al bregma: AP 0 mm, L 3 mm y V 7 mm, de acuerdo con el Atlas de Paxinos y Watson ⁷.

Una vez colocada la sonda de microdiálisis en el cuerpo estriado, se mantuvo al animal en el estereotáxico, recolectando muestras de perfusato durante 6 h.

Diseño experimental

Una vez colocada la sonda en el cuerpo estriado se inició la recolección de muestras de perfusato. Para lograr la estabilización del sistema y determinar el nivel basal de las distintas sustancias en el perfusato, la inyección de la dosis de 100 mg/kg, i.p. de α -metildopa (grupo tratado, n=4) o de solución fisiológica i.p. (grupo control, n=4) se realizó dos horas después de haber colocado la sonda en el cuerpo estriado. Se consideró como nivel basal al promedio de la concentración de tres muestras basales previas a la administración de la droga. Luego se recogieron muestras durante las 4 horas siguientes a la inyección de α -metildopa o solución fisiológica. Las muestras fueron procesadas inmediatamente después de su recolección.

Sistema de microdiálisis

Se perfundió la sonda con una solución de la siguiente composición: CaCl_2 2,3-mM, Na_2HPO_4 1,2 mM, NaH_2PO_4 0,3 mM, KCl 3,4 mM y NaCl 140 mM. Se utilizó una bomba de perfusión KD Scientific a una velocidad de 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Cada muestra de perfusato fue el producto de 20 min de recolección.

Análisis de las muestras

Para el análisis por HPLC con detección electroquímica, a cada muestra de perfusato se le agregó 30 μl de agua bidestilada.

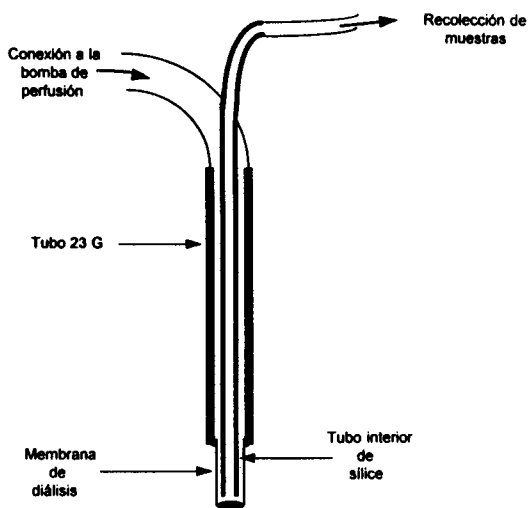


Figura 1. Esquema de la sonda de microdiálisis.

Se utilizó un cromatógrafo Konik 500A con válvula inyectora Rheodyne 7125 y loop de 20 μ l, equipado con una columna Hamilton PRP-1 (150 x 4,1 mm). La detección electroquímica se realizó mediante un detector BAS, modelo LC-4C, situado a un potencial de 0,78 V con respecto a un electrodo de referencia de Ag/AgCl. La fase móvil utilizada fue la siguiente: ácido cítrico 0,12 M, Na₂HPO₄ 2 mM, EDTA 1 mM, ácido hexanosulfónico 0,9 mM en agua y metanol 0,5%. La solución acuosa fue llevada a pH 3,8 con NaOH.

Se determinaron las concentraciones de dopamina, α -metildopa y l-dopa en cada muestra y se expresaron como pg/30 μ l de perfusato o como % del nivel basal.

Las drogas utilizadas fueron: l-dopa (Roche), α -metildopa (Phoenix-Arg.) y dopamina (Sigma).

RESULTADOS

En la Figura 2 se observa los niveles de dopamina en las muestras de perfusato en función del tiempo de perfusión. El contenido de dopamina en las muestras se expresa como % del nivel basal. Se consideró como 100% del nivel basal al promedio (166pg/30 μ l) de la concentración de tres muestras basales previas a la administración de α -metildopa. Para determinar el nivel basal se utilizaron las muestras recogidas 1 h después de haberse implantado la sonda. Dicho intervalo se considera suficiente para evitar las variaciones en los niveles de dopamina ocasionados por la injuria producida al implantar la sonda. Se observa que a partir de aproximadamente 120 minutos de administrada la droga, los niveles de dopamina en las muestras del grupo tratado (n=4, p<0.05 vs. grupo control) son mayores que los del grupo control (n=4).

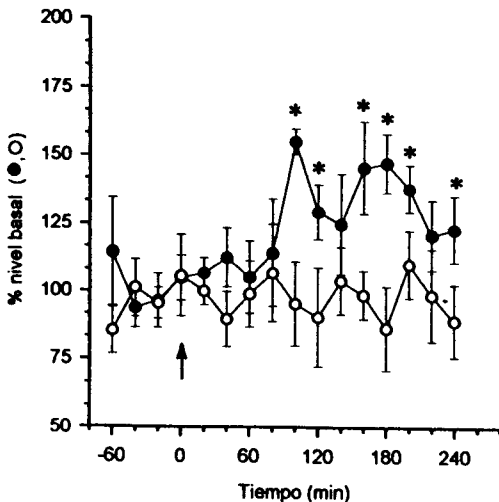


Figura 2. Niveles de dopamina en muestras de perfusato en función del tiempo. La α -metildopa (100 mg/kg, i.p.), produjo luego de 60 minutos de administrada, un incremento en la concentración de dopamina en las muestras de perfusato. Esto indicaría una mayor liberación de dopamina en el cuerpo estriado.

p < 0,05 con respecto al grupo control.

• α -metildopa o control

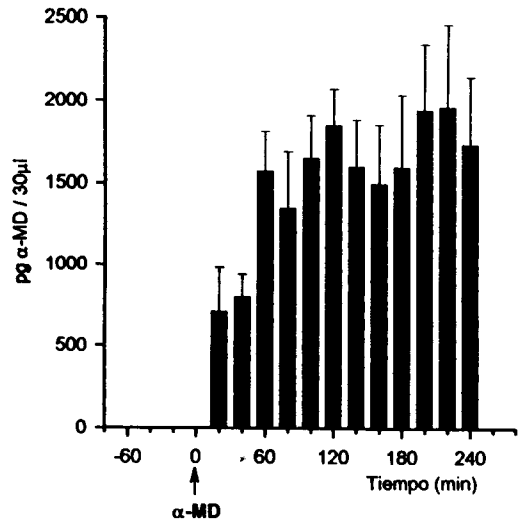


Figura 3. Aparición de α -metildopa en muestras de perfusato en función del tiempo. La administración de α -metildopa (100 mg/kg, i.p.) produjo su aparición en niveles detectables en las muestras de perfusato. Esto sugiere la acumulación de la droga en el cuerpo estriado.

En la Figura 3 se observa la aparición de α -metildopa en las muestras de perfusato en función del tiempo de perfusión para el grupo de animales tratado. El contenido de α -metildopa se expresó como pg/30 μ l de perfusato. Posteriormente a la inyección (i.p.) de la dosis de 100 mg/kg de α -metildopa se detectó la aparición de la droga en las muestras analizadas.

La Figura 4 ilustra la aparición de l-dopa en las muestras de perfusato. De la misma forma que en el caso de α -metildopa, se utilizó la medida de la concentración de l-dopa expresada como pg/30 μ l de perfusato para graficar la aparición del precursor. Los niveles de l-dopa en las muestras previas a la inyección de la dosis de α -metildopa fueron lo suficientemente bajos como para no ser detectados.

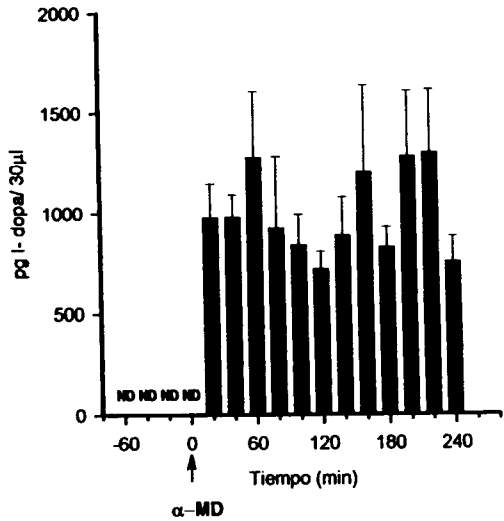


Figura 4. Aparición de l-dopa en muestras de perfusato en función del tiempo. La aparición del precursor l-dopa luego de la inyección de una dosis de 100 mg/kg, i.p. de α -metildopa, en las muestras de perfusato sugiere una inhibición de la enzima decarboxilasa de aminoácidos aromáticos encargada de la transformación de l-dopa en dopamina.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo hemos estudiado los efectos de α -metildopa, un inhibidor de la decarboxilasa de aminoácidos aromáticos, sobre la neurotransmisión dopaminérgica utilizando la técnica de perfusión intracerebral por microdiálisis. Los resultados obtenidos nos permitieron observar que la administración de α -metildopa, en una dosis de 100 mg/kg (i.p.) produjo un incremento en la concentración de dopamina en las muestras de perfusato con respecto al nivel basal. Al mismo tiempo se observó que tras la inyección del fármaco se producía la aparición del precursor de la dopamina, l-dopa, en las muestras de perfusato.

Básicamente, la técnica de perfusión por microdiálisis consiste en introducir una sonda en un tejido determinado, la cual tiene en su extremo una membrana de diálisis. Esta sonda se perfunde con una solución salina mediante una bomba. Las sustancias que se encuentren en el espacio extracelular o que se liberen al mismo, difundirán dentro de la sonda y serán arrastradas por la solución de perfusión. Estas muestras de perfusato se analizan luego usando distintas técnicas analíticas.

En nuestro laboratorio iniciamos nuestros estudios utilizando un modelo de sonda concéntrica, ya que el mismo es de fácil ensamblado y bajo costo. Los valores obtenidos de porcentaje de recuperación para dopamina, α -metildopa y l-dopa fueron aproximadamente 10%, los cuales son habitualmente observados para este modelo de sonda ^{6,8}.

La microdiálisis intracerebral representa una herramienta muy útil para investigar los cambios inducidos fisiológicamente y farmacológicamente en los niveles extracelulares de neurotransmisores *in vivo*. Para neurotransmisores como dopamina, acetilcolina y noradrenalina, estos cambios reflejarían la actividad de las

neuronas en la vecindad de la sonda. El seguimiento de los niveles de neurotransmisores y sus metabolitos por medio de la microdiálisis *in vivo* indudablemente nos ofrece la posibilidad de evaluar, en función del tiempo y en un mismo animal, la respuesta de los sistemas neuronales a los distintos tratamientos farmacológicos ⁸.

Analizando los resultados obtenidos en el presente trabajo, vemos que la dosis utilizada de α -metildopa de 100 mg/kg (i.p.) produjo un incremento en la concentración de dopamina en las muestras de perfusato. Este incremento es notable a partir de los 120 minutos de haber realizado la inyección y tiende a mantenerse en las muestras siguientes. Es importante destacar también que en las muestras obtenidas posteriormente a la inyección de α -metildopa se observó la aparición de cantidades crecientes del fármaco así como también del precursor de la dopamina, l-dopa.

La α -metildopa fue sintetizada primero como un inhibidor de la decarboxilasa de aminoácidos aromáticos y luego se descubrió su actividad como agente antihipertensivo ³. La administración de esta droga produce alteraciones importantes en los niveles de catecolaminas y otras aminas biógenas en el sistema nervioso central ^{9,10}.

La acción sobre la decarboxilasa de aminoácidos aromáticos produciría un aumento en la concentración de l-dopa y así el incremento en las muestras de perfusato. El aumento de este aminoácido también se ha observado con la perfusión *in situ* de inhibidores irreversibles de la enzima en el locus coeruleus tal como difluormetildopa ¹¹. Por otra parte, al ser esta droga un inhibidor del tipo competitivo es biotransformada por la decarboxilasa a α -metildopamina, la cual puede ser transformada a α -metilnoradrenalina por la dopamina β -hidroxilasa, enzima presente en las neuronas noradrenérgicas que cataliza la conversión de dopamina en noradrenalina ^{2, 12}. De esta manera la síntesis de dopamina y de aquellos productos relacionados con su biosíntesis se encontraría afectada.

Teniendo en cuenta las características de la técnica de perfusión intracerebral por microdiálisis, el incremento observado en la concentración de dopamina en las muestras de perfusato a partir de los 120 minutos nos indicaría sin embargo una mayor liberación del neurotransmisor al espacio extracelular. Conway *et al.* ¹³ realizaron un estudio sobre cuerpo estriado de rata utilizando cortes de tejido y fraccionamiento subcelular y describieron que la α -metildopamina reemplazaba a la dopamina en los terminales nerviosos y liberándose en forma similar al neurotransmisor endógeno. La biosíntesis de α -metildopamina a partir de la decarboxilación de la α -metildopa podría ser la causa de la mayor liberación de dopamina a través de un desplazamiento del neurotransmisor almacenado. Aunque en el presente trabajo no se ha podido realizar la medición de este producto, sería importante su detección. Los autores mencionados ¹³ hallaron que la disminución del nivel de dopamina en el cuerpo estriado, posterior a la administración de una dosis de 200 mg/kg (i.p.) de α -metildopa, era acompañada por un incremento en los niveles de α -metildopamina y el efecto máximo era alcanzado 4 horas después de la inyección de α -metildopa ⁴.

En conclusión, mediante la técnica de perfusión por microdiálisis se ha observado el efecto de α -metildopa sobre la síntesis de la dopamina estriatal como así también un incremento de la concentración de este neurotransmisor en las muestras de perfusato, probablemente por alguna acción sobre la liberación neuronal del mismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Day, M., Rand, M. (1963) *J. Pharm. Pharmacol.* **15**: 221-4
2. Finch, L., A. Herson & P. Hicks (1975) *Br. J. Pharmacol.* **54**: 445-51
3. Rudd, P. & T.F. Blaschke (1985) "Agentes antihipertensivos y farmacoterapia de la hipertensión" en "Goodman y Gilman: *Las Bases farmacológicas de la terapéutica*", 7a. ed. trad. esp. (A. Goodman Gilman, L. Goodman, T. W. Rall, F. Murad, eds.), Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, págs. 751-2
4. Louis, W., E. Conway, R. Summers, P. Beart & B. Jarrot (1984) *Hypertension* **5** (supl. II vol. 6.): 40-4
5. Ungerstedt, U., M. Herrera-Marschitz, U. Jungnelius, L. Stähle, U. Tossman & T. Zetterström (1982) "Dopamine synaptic mechanisms reflected in studies combining behavioural recordings and brain dialysis", en "*Advances in dopamine research*" (M. Kotisaka, T. Shomari, Y. Tsukada y G. Woodruff, eds.), Pergamon Press, New York, págs. 219-31
6. Giovanni, A., Sonsella, P. K. & R.E. Heikkila (1991) "Studies on the mechanism of MPTP- and MPP+ -induced neurotoxicity in rats and mice using in vivo dialysis", en "*Monitoring molecules in neuroscience*" (H. Rollema, B.H.C. Westernik, & W.J. Driifhout, eds.), University Centre for Pharmacy, Groningen, The Netherlands, págs. 400-3
7. Paxinos, G. & Ch. Watson (1982) "The rat brain in stereotaxic coordinates" ed. Academic Press, San Diego
8. Benveniste, H. (1989) *J. Neurochem.* **52**: 1667-79
9. Conway, E., B. Jarrot, W. Louis (1978) *Neuropharmacology* **17**: 355-61
10. Chalmers, J., J.B. Minson & V. Choy (1984) *Hypertension* **6** (Supl. II): II-16 - II-21
11. Robert, F., L. Lambás-Señas, C. Ortemann, J.F. Pujol & B. Renaud (1993) *J. Neurochem.* **60**: 721-9
12. Van Zwieten, P., M. Thoolen & P. Timmermans (1984) *Hypertension* **6** (supl II): II-28 - II-33
13. Conway, E.L., B. Jarrot & W.J. Louis (1978) *Neuropharmacology* **17**: 355-61