

Metildopa en ratas con desnervación sinoaórtica: un perfil dinámico y cinético mediante microdiálisis

JAVIER A. W. OPEZZO, CHRISTIAN HÖCHT, GUILLERMO F. BRAMUGLIA,
CARLOS A. TAIRA*

RESUMEN

Se estudió la farmacocinética de la metildopa (MD) (50 mg/kg; ip) y su acción sobre el metabolismo dopaminérgico en ratas con operación simulada (OS) y en ratas con desnervación sinoaórtica (DSA) mediante la técnica de microdiálisis. Se insertó una sonda de microdiálisis de tipo *shunt* en la arteria carótida y se situó una sonda concéntrica de microdiálisis en el cuerpo estriado. El contenido de MD, ácido homovanílico (HVA) y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) en los dializados se analizó mediante HPLC-DE (cromatografía líquida de alta presión acoplada a detección electroquímica). La concentración máxima de MD en los dializados arteriales no fue significativamente distinta en ambos grupos, pero la vida media fue de $171,6 \pm 53,0$ minutos en ratas con OS ($n = 4$) y de $28,3 \pm 8,1$ en ratas con DSA ($n = 4$; $p < 0,05$).

En los dializados estriatales de las ratas con OS, la MD alcanzó una concentración estable durante todo el experimento. En las ratas con DSA se observaron niveles menores del fármaco con una disminución rápida.

Los niveles de HVA y DOPAC en los dializados estriatales de las ratas con DSA disminuyeron con respecto a su valor basal, en un 25% y 20%, respectivamente.

En conclusión, con el empleo de la técnica de microdiálisis se observó que la MD, en una dosis que altera el metabolismo dopaminérgico estriatal, muestra diferentes perfiles cinéticos en dializados de sangre arterial y de cuerpo estriado en ratas con DSA. REV ARGENT CARDIOL 1999; 67: 491-496.

Palabras clave Farmacocinética - Microdiálisis - Sangre arterial - Estriado - Metildopa - Desnervación sinoaórtica

INTRODUCCION

La técnica de microdiálisis se transformó rápidamente en un método útil para el muestreo *in vivo* de neurotransmisores, fármacos y metabolitos. (1) Además, esta técnica permite el muestreo continuo de niveles plasmáticos sin la necesidad de tomas repetidas de sangre. La aplicación de esta técnica para el estudio del metabolismo de fármacos y la farmacocinética en ratas se informó en varios trabajos. (2, 3)

La metildopa (MD) es un agente antihipertensivo de acción central que originalmente fue diseñado como un inhibidor de la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, enzima involucrada en la síntesis de catecolaminas. Este fármaco produce un

efecto antihipertensivo a través de la acción de un metabolito en el sistema nervioso central y la activación de adrenorreceptores centrales. (4, 5) Por otro lado, en el modelo experimental en ratas con presión arterial lábil provocada por desnervación sinoaórtica (DSA) se demostró sensibilidad a la acción hipotensora de la MD y la clonidina. (6, 7)

Teniendo en cuenta entonces que la MD debe biotransformarse para ejercer su acción, el propósito de este trabajo fue estudiar el efecto del fármaco sobre el metabolismo dopaminérgico cerebral y obtener un perfil cinético en ratas con DSA a través del estudio del curso temporal de las concentraciones de MD en dializados de sangre arterial y de cerebro

Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Este trabajo fue financiado por subsidios de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires y del Fondo Nacional de Ciencia y Técnica (FONCYT) de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Ministerio de Cultura y Educación, Argentina

* Miembro de la Carrera de Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Trabajo recibido para su publicación: 5/99. Aceptado: 7/99

Dirección para separatas: Javier A. W. Opezzo, Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina - Tel. +(54-11)-4964-8265 - Fax: +(54-11)-4508-3645 - E-mail: jopezzo@huemul.ffyb.uba.ar

con el empleo de la técnica de microdiálisis. Al mismo tiempo, se efectuó el registro de la frecuencia cardíaca y la presión arterial para evaluar los efectos cardiovasculares.

MATERIALES Y METODOS

Procedimiento experimental y técnica analítica

Se utilizaron ratas Wistar macho (250-350 g). La desnervación sinoaórtica se realizó según el método descrito por Krieger (8) en ratas anestesiadas con hidrato de cloral (250 mg/kg; ip). La técnica básicamente consiste en la sección de los nervios aórticos a la altura de las arterias carótidas y la disección bilateral de las bifurcaciones carotídeas para la remoción de los nervios carotídeos. A las ratas control se les practicó una operación simulada (OS). Los experimentos se realizaron siete días después de la operación correspondiente.

El día del experimento, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de cloralosa (50 mg/kg; ip) y uretano (500 mg/kg; ip). La anestesia se mantuvo durante el experimento mediante la administración de suplementos del anestésico.

En nuestro laboratorio diseñamos una sonda de microdiálisis vascular de tipo *shunt* con una entrada y dos salidas vasculares. La entrada y una salida vascular de la sonda heparinizada (50 U/ml) se insertaron en la arteria carótida izquierda, mientras que la salida remanente se conectó a un transductor de presión Statham Gould P23ID acoplado a un polígrafo Grass 79D. La presión arterial media (PAM) se calculó según la fórmula: presión diastólica + (presión sistólica - presión diastólica)/3. La frecuencia cardíaca (FC) se calculó por conteo de las ondas pulsátiles de presión arterial.

Luego se insertó una sonda de microdiálisis concéntrica en el cuerpo estriado izquierdo o derecho: A/P 0 mm, L/M 3 mm, V/D 7 mm, desde el bregma. (9)

Las sondas de microdiálisis vasculares y estriales se perfundieron con una solución compuesta de 147 mM NaCl, 2,4 mM CaCl₂, 4 mM KCl, pH 7,3, mediante una bomba de perfusión a un flujo de 2 µl/min. Se recolectaron muestras refrigeradas a intervalos de 15 minutos en 10 µl HCl 0,01 N. Los niveles de metildopa, DOPAC y HVA se determinaron por cromatografía de alta presión acoplada a detección electroquímica (HPLC-DE) utilizando una columna SepStik ODS (BAS) 5-µm, C18, 100 x 1 mm y un detector electroquímico de carbón-vidrio. El electrodo de trabajo se fijó a 0,65 V con respecto al electrodo de referencia Ag/AgCl. La composición de la fase móvil utilizada fue: 0,76 M NaH₂PO₄·H₂O, 0,5 mM EDTA, 1,2 mM ácido 1-octano sulfónico y 1% metanol; pH = 3,4.

Análisis farmacocinético

El análisis farmacocinético se realizó mediante la utilización del método de regresión no lineal. Se estudió el curso temporal de los niveles de metildopa en el dializado de sangre arterial (C_d) en función del tiempo luego de la administración de metildopa.

Para la estimación de parámetro farmacocinético tiempo de vida media (t_{1/2}) se calculó previamente la constante de velocidad de eliminación Ke ajustando los datos a un modelo monocompartmental acorde con la siguiente ecuación general:

$$C_d = \sum_{i=1}^n a_i \cdot e^{-b_i t}$$

en la cual C_d es la concentración del fármaco en el dializado a tiempo "t", "n" es el número de términos exponenciales, a_i y b_i son los coeficientes y exponentes para determinar. (10)

Para cada animal se estableció un valor de Ke. Finalmente, el t_{1/2} se calculó según la siguiente fórmula: (10)

$$t_{1/2} = 1n2/Ke$$

Estadística

Los datos se expresaron como media ± error estándar de la media. Las comparaciones entre medias se realizaron mediante la prueba de la t de Student. (11) En el caso de comparaciones múltiples se utili-

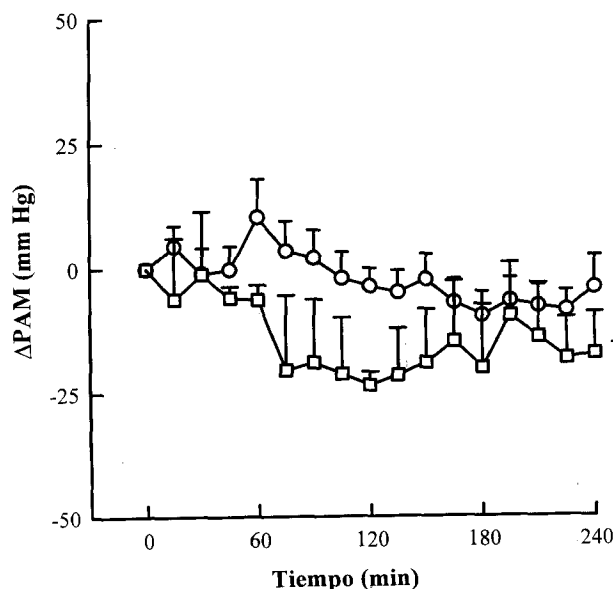


Fig. 1. Curso temporal de los cambios de presión arterial media (ΔPAM) luego de la administración de metildopa (50 mg/kg; ip) en ratas con OS (círculos) y en ratas con DSA (cuadrados). Cada punto representa la media ± EEM de cuatro animales.

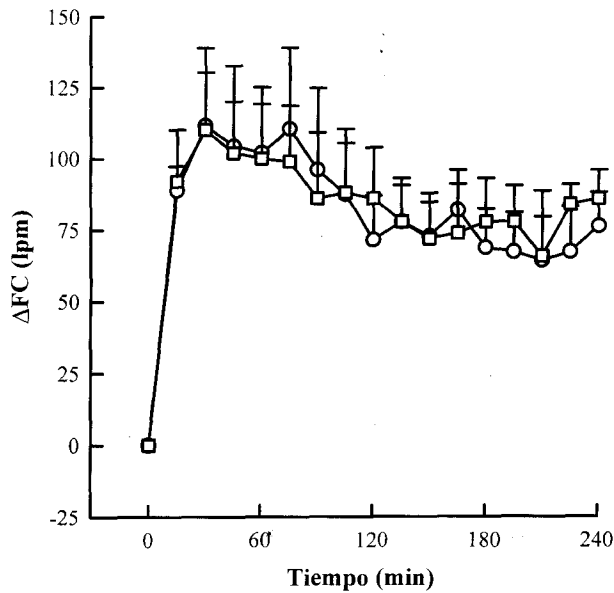


Fig. 2. Curso temporal de las modificaciones de la frecuencia cardíaca (ΔFC) luego de la administración de metildopa (50 mg/kg; ip) en ratas con OS (círculos) y en ratas con DSA (cuadros). Cada punto representa la media \pm EEM de cuatro ratas.

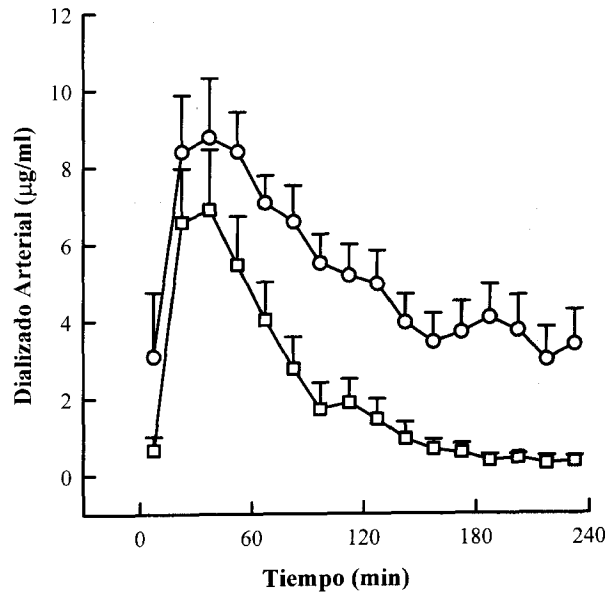


Fig. 3. Concentraciones de metildopa en dializados obtenidos de sangre arterial en ratas con OS (círculos) y en ratas con DSA (cuadros). Cada curva muestra el curso temporal luego de la administración de metildopa (50 mg/kg; ip). Cada punto representa la media \pm EEM de cuatro ratas.

zó la prueba de Bonferroni, previa aplicación del análisis de la varianza de medidas repetidas. (11)

RESULTADOS

Los valores basales de PAM y de FC medidos sie-

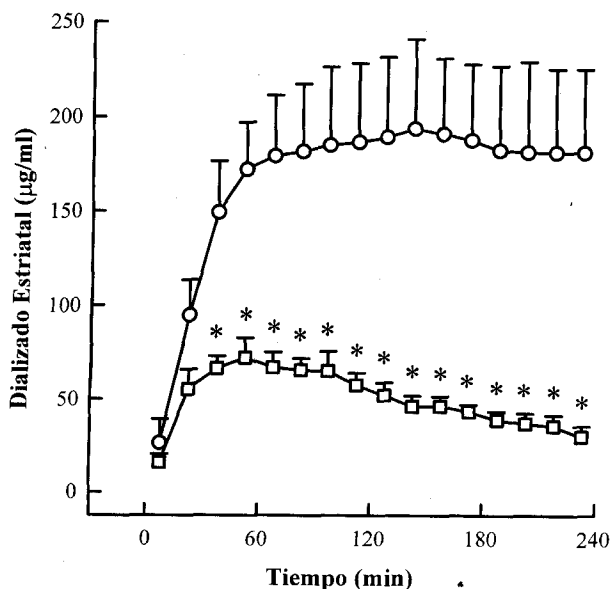


Fig. 4. Concentraciones de metildopa en dializados obtenidos de cuerpo estriado en ratas con OS (círculos) y en ratas con DSA (cuadros). Cada curva muestra el curso temporal luego de la administración de metildopa (50 mg/kg; ip). Cada punto representa la media \pm EEM de cuatro ratas. * $p < 0,05$ versus el correspondiente valor de ratas con SO (prueba de Bonferroni).

te días después de la operación correspondiente en ratas anestesiadas no fueron significativamente distintos en ratas con OS (PAM: $52,4 \pm 7,9$ mm Hg; FC: 320 ± 22 lpm; $n = 4$) y en ratas con DSA (PAM: $75,0 \pm 12,5$ mm Hg; FC: 362 ± 50 lpm; $n = 4$).

La metildopa (50 mg/kg; ip) indujo un descenso no significativo de la PAM en ratas con DSA (Figura 1). Se produjo una taquicardia sostenida en ambos grupos de ratas sin que se hallaran diferencias significativas entre ellos (Figura 2). Además, el aumento máximo de la FC se observó en ambos grupos a los 45 minutos después de administrado el fármaco (ΔFC : ratas con OS 112 ± 29 lpm, $n = 4$; ratas con DSA 110 ± 20 lpm, $n = 4$).

La Figura 3 muestra los valores promedio de las concentraciones de MD en los dializados arteriales de los dos grupos experimentales. Se observa que la concentración máxima de metildopa en el dializado arterial no fue significativamente distinta en ambos grupos de ratas (ratas con OS $8,8 \pm 1,5$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; ratas con DSA $6,9 \pm 1,6$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Sin embargo, el perfil cinético del dializado de sangre arterial mostró diferencias entre ratas con OS y ratas con DSA ya que el $t_{1/2}$ obtenido fue de $171,6 \pm 53,0$ min para ratas con OS ($n = 4$) y de $28,3 \pm 8,1$ min para ratas con DSA ($n = 4$, $p < 0,05$ versus ratas con OS).

Los niveles de metildopa en el dializado de núcleo estriado mostraron que el fármaco se distribuyó rápidamente en el sistema nervioso central de ambos grupos. En el grupo de ratas con OS, los ni-

veles del fármaco se estabilizaron en una meseta hasta el final del tiempo de recolección. Por otra parte, el grupo de ratas con DSA mostró niveles menores del fármaco y, a su vez, una desaparición rápida a diferencia del grupo control (Figura 4).

Dos horas después de administrada la metildopa, los niveles de DOPAC y de HVA cayeron hasta el $80,5 \pm 4,9\%$ y el $74,8 \pm 9,7\%$ de su valor basal, respectivamente, en las ratas con DSA. No se observaron cambios en los niveles de estos metabolitos en el grupo de las ratas con OS.

DISCUSION

Se sabe que la desnervación sinoaórtica no induce un aumento permanente de la presión arterial, pero frecuentemente aumenta la labilidad de la presión arterial. (7, 12, 13) Por otra parte, se observó que la desnervación sinoaórtica produce un aumento marcado de la presión arterial sistólica cuando ésta se determina a través del método pletismográfico de cola. (6, 8, 12) En nuestro trabajo encontramos que la presión arterial media y la frecuencia cardíaca, medidas siete días después de la operación correspondiente a través de un método directo, fueron mayores en ratas con DSA anestesiadas que en ratas con OS anestesiadas; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

De acuerdo con nuestros resultados, la MD (50 mg/kg; ip) indujo una caída de la presión arterial media en el grupo DSA, pero este efecto no difirió significativamente del observado en el grupo control. En un trabajo previo (6) se informó que la misma dosis de MD induce una acción depresora mayor de la presión arterial en ratas con DSA que en ratas con OS. Sin embargo, en este trabajo se determinó únicamente la presión arterial sistólica en ratas despiertas e inmovilizadas para la medición, para lo cual se utilizó el método del pletismógrafo de cola. Además, se encontró que la hipertensión neurogénica provocada por la desnervación sinoaórtica no se mantiene en ratas anestesiadas. (14) Como se mencionó anteriormente, en nuestro estudio trabajamos utilizando ratas anestesiadas y con un método de medida directa de la presión arterial.

La administración de MD provocó una acción taquicardizante similar en ambos grupos de ratas y el efecto máximo se observó al mismo tiempo. Es probable que esta taquicardia se deba a la transformación periférica del fármaco en metilnoradrenalina (MNA), la cual tiene una actividad cronotrópica positiva similar a la noradrenalina. (15)

La concentración máxima de MD en los dializados de sangre arterial fue similar en ratas con DSA y ratas con OS; sin embargo, el tiempo de semivida fue significativamente menor en el grupo con DSA que en el grupo control. Un hecho destacable es que

el efecto cardíaco máximo y la concentración máxima de MD en el dializado de sangre arterial se obtuvieron en tiempos similares, lo cual sugeriría una correlación entre el efecto cardíaco y la concentración del fármaco en sangre arterial.

Los perfiles de eliminación en ambos grupos de animales fueron distintos, los cuales mostraron un aclaramiento del fármaco mucho más rápido en ratas con DSA que en ratas con OS. Este resultado podría sugerir que la biotransformación y/o excreción del fármaco se ven alteradas por la desnervación sinoaórtica. Varios autores comunicaron un aumento del tono simpático periférico y un aumento de la síntesis de catecolaminas luego de la desnervación sinoaórtica. (16-18) La mayor eliminación de MD en ratas con DSA podría deberse a una alteración en la biotransformación de MD en metildopamina (MDA) y/o MNA.

Los dializados estriatales de las ratas con OS mostraron que la MD alcanzó una concentración estable durante las cuatro horas de recolección, lo cual impidió el cálculo de algún parámetro cinético de eliminación. En cambio, los niveles de MD alcanzados en los dializados estriatales de ratas con DSA fueron menores que en el grupo control y además se observó una fase de eliminación durante el tiempo de recolección. Las diferencias observadas entre ambos grupos podrían sugerir perfiles de acumulación y/o eliminación diferentes en el sistema nervioso central. Específicamente, la MD entra en el sistema nervioso central, donde es biotransformada en MNA a través de descarboxilación seguida de betahidroxilación. La MNA es un agonista de adrenergicos centrales, la cual al activar estos receptores reduce el tono simpático periférico. (4, 5, 19) La MD es transportada a través de la barrera hematoencefálica por un proceso activo (20) y es excretada por la orina mayoritariamente como el conjugado sulfatado. (21)

Los niveles de MD menores observados en dializados estriatales de ratas con DSA podrían deberse a un transporte menor a través de la barrera hematoencefálica, debido a que la eliminación del fármaco de la sangre arterial está aumentada en este grupo de ratas. Además, la MD alcanza diferentes estructuras del sistema nervioso central que poseen actividad neuronal distinta. (22) Se sabe que la desnervación sinoaórtica modifica la actividad catecolaminérgica en varias estructuras cerebrales y en la médula espinal. (23-25) Por otro lado, el núcleo del tracto solitario es la estructura blanco de la MD (4, 5) y es posible que la biotransformación del fármaco esté acelerada en las estructuras bulbares. Los comportamientos diferentes de la MD observados en las ratas con DSA pueden deberse a la alteración de la actividad aminérgica presente en estos animales.

La administración de MD provocó una disminución significativa de los niveles de HVA y DOPAC, metabolitos mayoritarios de la dopamina, en las ratas con DSA. Esta disminución podría deberse a la menor síntesis de dopamina estriatal ya que la MD inhibe a la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, enzima involucrada en la síntesis de dopamina. Esto sugiere que la MD estaría alterando la neurotransmisión dopaminérgica estriatal en las ratas con DSA.

CONCLUSION

Se ha realizado un primer estudio cinético y dinámico del antihipertensivo MD utilizando la técnica de microdialisis en ratas anestesiadas con desnervación sinoaórtica. Los resultados sugieren que la desnervación sinoaórtica modificaría los perfiles de eliminación del antihipertensivo MD en sangre arterial y en el cuerpo estriado cerebral. Por otra parte, también alteraría la neurotransmisión dopaminérgica, hecho que se ve reflejado en el cambio que se produce en los niveles de DOPAC y HVA.

SUMMARY

METHYLDOPA IN RATAS WITH SINOARTIC DENERVATION: A DYNAMIC AND KINETIC PROFILE WITH MICRODIALYSIS

The pharmacokinetics of methyl dopa (MD) (50 mg/kg; i.p.) and the effects on the dopaminergic metabolism was studied in anesthetized sham operated (SO) or sinoaortic denervated (SAD) rats, by means of the microdialysis technique. A vascular shunt probe was inserted into the carotid artery and concentric probe was placed in the striatum. Levels of MD, homovanillic acid (HVA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) were measured by high-pressure liquid chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC-EC). Peak concentrations of MD in arterial blood were similar in both groups of rats but the $t_{1/2}$ was 171.6 ± 53.0 min for SO rats ($n = 4$) and 28.3 ± 8.1 min for SAD rats ($n = 4$, $p < 0.05$). Methyl dopa levels were stable along the experiment in the control group (SO). Lower levels of MD and a quick decrease were seen in striatum of SAD rats. Homovanillic acid and DOPAC levels in the striatal dialysates of SAD rats were decreased in 20% and 25%, respectively, compared to baseline. In conclusion, employing a microdialysis technique, we found different kinetic profiles of MD in dialysates from arterial blood and striatum of SO and SAD rats, at a dose of MD that alters the striatal dopaminergic metabolism.

Key words Pharmacokinetic - Microdialysis - Arterial blood - Striatum - Methyl dopa - Sinoaortic denervation

Agradecimiento

Al Laboratorio Phoenix Argentina por la donación de la metildopa.

BIBLIOGRAFIA

1. Benveniste H, Hüttemeier PC. Microdialysis. Theory and application. *Progress in Neurobiology* 1990; 35: 195-215.
2. Chen Z, Steger RW. Plasma microdialysis. A technique for continuous plasma sampling in freely moving rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993; 29: 111-118.
3. Elmquist WF, Sawchuk RJ. Application of microdialysis in pharmacokinetics studies. *Pharm Res* 1997; 14: 267-288.
4. Robertson D, Tung C-H, Goldberg MR, Hollister AS, Gergens JF, Oates JA. Antihypertensive metabolites of α -methyl dopa. *Hypertension* 1984; 6: II-45-II-50.
5. van Zwieten PA, Thoolen MJM, Timmermans PBWM. The hypotensive activity and side effects of methyl dopa, clonidine and guanfacine. *Hypertension* 1984; 6: II-28-II-33.
6. Taira CA, Celuch SM, Enero MA. Effects of acute and short-term treatment with antihypertensive drugs in sinoaortic denervated rats. *Gen Pharmacol* 1983; 14: 657-661.
7. Taira CA, Enero MA. Interaction between clonidine and physostigmine in normals rats and in rats after sinoaortic denervation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989; 339: 522-527.
8. Krieger EM. Neurogenic hypertension in the rats. *Circulation Res* 1964; 15: 511-521.
9. Paxinos G, Watson CH. The rat brain in stereotaxic coordinates (2^a ed). New York, Academic Press 1986.
10. Gibaldi M, Perrier D. Pharmacokinetics (2^a ed). New York, Marcel Dekker Inc 1982.
11. Brunning JL, Kintz BL. Computational Handbook of Statistics (2^a ed). Glenview, Illinois, Scott Foresman and Co 1977.
12. Norman Jr RA, Coleman TG, Dent AC. Continuous monitoring of arterial pressure indicates sinoaortic denervated rats are not hypertensive. *Hypertension* 1981; 3: 119-125.
13. Büchholz RA, Hubbard JW, Nathan MA. Comparison of 1-hour and 24-hours blood pressure recordings in central or peripheral baroreceptor-denervated rats. *Hypertension* 1986; 8: 1154-1163.
14. Alexander N. Plasma volumes and hematocrits in rats with chronic sinoaortic denervation hypertension. *Am J Physiol* 1979; 236: H92-H95.
15. Doxey J, Scutt A. Effect of α -methyl dopa on sympathetic nerve function in the pithed rat. *Eur J Pharmacol* 1974; 29: 320-326.
16. De Quattro V, Nagatsu T, Maronde R, Alexander N. Catecholamine synthesis in rabbits with neurogenic hypertension. *Circ Res* 1969; 24: 545-555.
17. De Quattro V, Alexander N. Altered norepinephrine synthesis of splanchnic vessels in neurogenic hypertension. *Eur J Pharmacol* 1974; 26: 231-235.
18. Alexander N, McClaskey J, Maronde R. Elevated plasma dopamine beta-hydroxylase activity in rats with neurogenic hypertension. *Life Sci* 1976; 18: 655-662.
19. Scriabine A. Pharmacology of antihypertensive drugs. New York, Raven Press 1980.
20. Bobik A, Jennings G, Jackman G, Oddie C, Korner P. Evidence for a predominantly central hypotensive effect of α -methyl dopa in humans. *Hypertension* 1986; 8: 16-23.
21. Campbell N, Sundaram R, Werness P, van Loon J, Weinshilboum R. Sulfate and methyl dopa metabolism: metabolite patterns and platelet phenol sulfotransferase activity. *Clin Pharmacol Ther* 1985; 37: 308-315.
22. Hayashi T, Nakamura K. Cerebral acting maps of hydralazine, clonidine, and α -methyl dopa in spontaneously hypertensive rats as demonstrated by the ¹⁴C-deoxy-D-glucose method. *Japan J Pharmacol* 1982; 32: 855-865.
23. Chalmers J, Petty M, Reid J. Participation of adrenergic and

- noradrenergic neurones in central connections of arterial baroreceptor reflexes in the rat. *Circ Res* 1979; 45: 516-522.
24. Nakamura K, Nakamura K. Influence of sino-aortic baroreceptor denervation on catecholamines, catecholamine-synthesizing enzymes and choline acetyltransferase activity in the brainstem nuclei of the rat. *Japan J Pharmacol* 1981; 31: 95-105.
25. Alexander N, Nakahara D, Ozaki N y col. Striatal dopamine release and metabolism in sinoaortic-denervated rats by in vivo microdialysis. *Am J Physiol* 1988; 254: R396-R399.