

INSTITUTO DE CARDIOLOGIA Y CIRUGIA CARDIOVASCULAR

Lipasa de lipoproteinas en cerebro. II. Ausencia de respuesta a la administración de 6-hidroxi dopamina en el ratón

Dr. Marcelino Lavin Palmieri, Dr. Daniel Sánchez Serrano

Lavin Palmieri, M.; D. Sánchez Serrano: *Lipasa de lipoproteinas en cerebro. II. Ausencia de respuesta a la administración de 6-hidroxi dopamina en el ratón.*

Se investigó el efecto de la administración seriada de 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) sobre la actividad de lipasa de lipoproteinas (PLP) cerebral en el ratón. La inyección intraperitoneal de 4 dosis (una por semana) de 6-OHDA, 100 mg/kg de peso, no produjo efecto sobre la actividad de LPL cerebral ni cambios en la depleción enzimática del cerebro por la administración de heparina (100 UI/kg de peso, vía intraperitoneal). La 6-OHDA tampoco ejerció efecto sobre la actividad LPL cerebral *in vitro*. Hubo una retención significativa ($p < 0,05$) de actividad LPL en corazón después de la administración de heparina en animales inyectados previamente con 6-OHDA. Se sugiere la existencia de diferencias estructurales importantes entre las LPL de cerebro y corazón.

INTRODUCCION

La administración sistémica de 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) provoca un aumento significativo de la actividad de lipasa de lipoproteinas (LPL) en el corazón de rata *in vivo* e *in vitro* junto a un descenso de la actividad lipolítica posheparina (ALPH) del suero *in vivo*. Por otra parte, la inyección de 6-OHDA en la cisterna magna de conejos provoca una disminución/significativa de la actividad LPL en corazón.²

Se ha dicho que la 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) en el animal adulto.^{3,4} Sin embargo, algunos autores han sugerido que la administración sistémica de 6-OHDA pudiera atravesar la BHE, "" como explicación a la hipofagia e hipodipsia producidas después de la administración sistémica de 6-OHDA⁶ y a la disminución significativa de la actividad de lipasa de lipoproteinas cerebral⁵ después de la administración de la droga en dosis seriadas a animales.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la administración sistémica de 6-OHDA en dosis seriadas ejercía algún efecto sobre la actividad de LPL cerebral.

*Especialista de I Grado en Bioquímica Clínica.

**Candidato a Doctor en Ciencias. Especialista de I Grado en Bioquímica Clínica.

MATERIAL Y METODO

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó 56 ratones albinos, machos, de 25-30 g de peso, en 2 experimentos. I) 40 animales fueron distribuidos en 2 grupos: 20 animales fueron inyectados con 6-OHDA (100 mg/kg de peso, vía intraperitoneal), disuelta en solución de ácido ascórbico al 0,1 % en suero fisiológico (una dosis semanal, durante 4 semanas); los otros animales fueron inyectados con solución de ácido ascórbico, según el mismo diseño, 48 h después de la última inyección; la mitad de los animales de cada grupo fue inyectada con solución de heparina (100 U/kg de peso, vía intraperitoneal), y la otra mitad con suero fisiológico. Los animales fueron anestesiados con éter y decapitados 10 min después, y la sangre fue colectada de modo que cada muestra provino de parejas de animales tratados en la misma forma. Los cerebros y corazones fueron extraídos enseguida, lavados en suero fisiológico frío, secados en papel de filtro y pesados (unos 60 mg). II) 16 ratones fueron sacrificados y los cerebros fueron homogeneizados en parejas e incubados en 4 condiciones diferentes: 1. sin heparina; 2. con heparina, 1 U/ml de volumen total; 3. con 6-OHDA, 0,3 mg/ml de volumen y 4. Con ambas drogas a las concentraciones finales descritas en 2 y 3. Cada matraz contuvo sulfito de sodio 1,89 mM para evitar la oxidación de 6-OHDA durante el lapso de incubación.¹ Un quinto matraz contuvo solamente heparina (sin sulfito) para determinar el grado de inhibición ejercido por el agente antioxidante sobre la actividad enzimática.

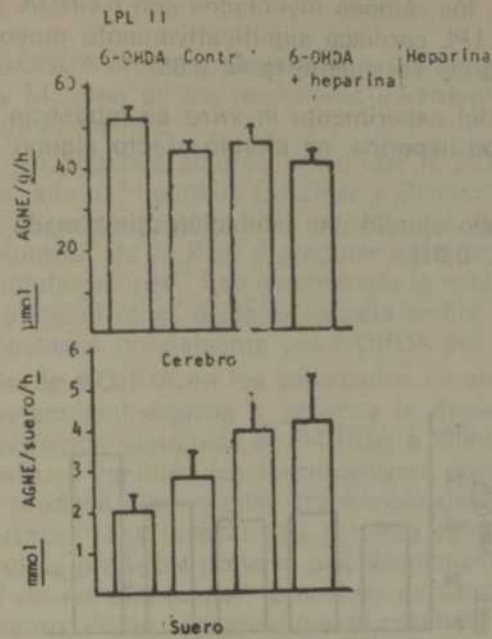
ENSAYO ENZIMATICO

El suero fue utilizado el mismo día de su obtención y los tejidos cerebral y cardíaco fueron congelados hasta su procesamiento, efectuado dentro de los 3 días que siguieron a su obtención. El medio de ensayo fue el descrito en otro trabajo para corazón,⁷ ligeramente modificado en las concentraciones relativas de Lipofundin 10 % y suero de caballo.⁸ Los tejidos fueron homogeneizados en homogeneizador del tipo Potter, con pistón y vaso de cristal. Los ácidos grasos no esterificados (AGNE) fueron determinados según *Dole y Meinertz*,⁹ modificado por *Salaman y Robinson*.¹⁰ La actividad enzimática fue expresada en mmol de AGNE/g de tejido húmedo/lj para cerebro y corazón y en mmol de AGNE / de suero/b.

Los datos experimentales fueron procesados mediante la prueba de t (experimento I) y la prueba t pareada (experimento II), y se aceptó un nivel del 5 % como significación estadística.

RESULTADOS

Los resultados del experimento I aparecen en las figuras 1 y 2. Ninguno de los grupos experimentales mostró niveles de actividad LPL cerebral estadísticamente diferentes comparados con el control o entre ellos. Los perfiles del ALPH y los cambios en la actividad LPL de corazón son similares a los informados en un trabajo anterior,¹ donde se empleó una dosis única de 6-OHDA, es decir, la ALPH en los animales inyectados por 6-OHDA solo es significativamente menos que la de animales inyectados con heparina solamente ($p < 0.05$) o con ambas drogas ($P < 0,05$) y la actividad LPL cardíaca en ratones tratados con 6-OHDA es significativamente mayor ($p < 0,05$) que en los controles. Sin embargo, en el trabajo actual apareció un nuevo aspecto: los ratones inyectados con 6-OHDA y heparina mostraron una actividad LPL cardíaca significativamente mayor que aquéllos inyectados con heparina solamente ($p < 0,05$).



6-OHDA: animales inyectados con la droga solamente.

6-OHDA + heparina: inyectados con 6-OHDA y con heparina.

Heparina: inyectados con heparina solamente.

Control: inyectados con suero fisiológico acidificado solamente (ver detalles en Material y Método).

Los valores representan media \pm ESM, $n = 10$ para cerebro y $n = 5$ para suero.

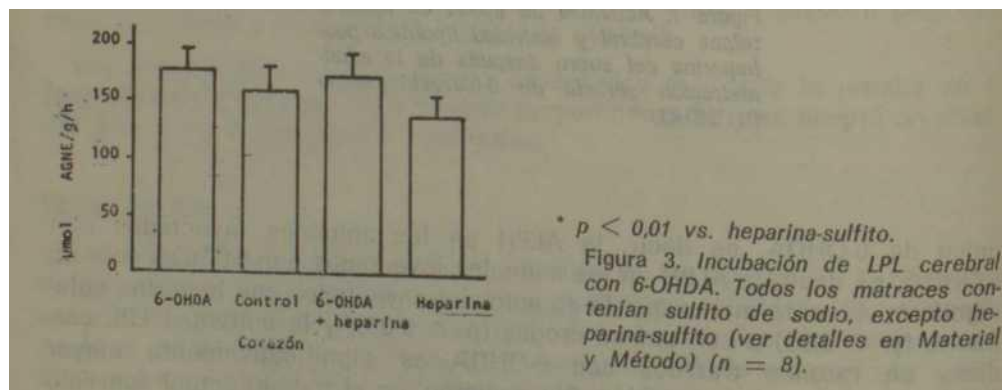
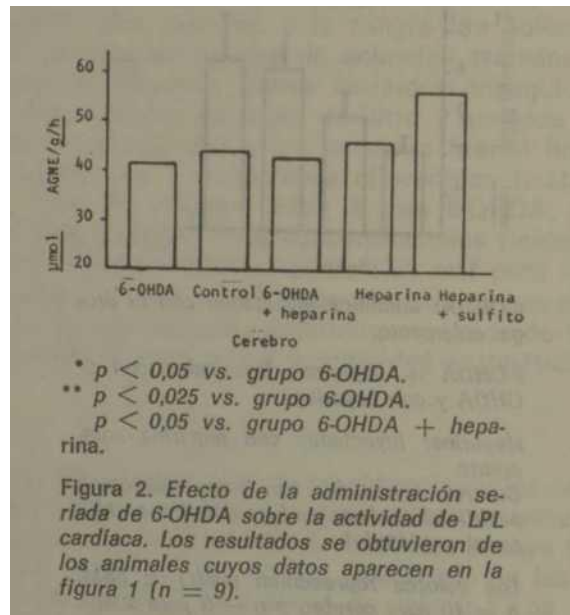
* $p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA.

(Prueba de la t , una cola).

Figura 1. Actividad de lipasa de lipoproteínas cerebral y actividad lipolítica post-heparina del suero después de la administración seriada de 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

Los resultados del experimento *in vitro* se muestran en la figura 3, La 6-OHDA sola, o con heparina, no ejerció efecto alguno sobre la actividad LPL cerebral.

El sulfito de sodio ejerció una inhibición aproximada del 16 % sobre la actividad LPL ($p < 0,01$).



DISCUSION

Se sabe que la 6-OHDA produce degeneración de las terminaciones nerviosas sinápticas y bloqueo de los receptores adrenérgicos,¹¹ e interfiere la biosíntesis de noradrenalina.¹²

Como se dijo antes, algunos autores creen que la 6-OHDA no atraviesa la BHE en el animal adulto,^{3,4} aunque *Gardiner y Bennett*⁶ han considerado la posibilidad de que esta droga pudiese penetrar en el cerebro a través de "regiones deficientes" de la BHE y producir efectos centrales. Recientemente, *Smith y colaboradores*¹³ han demostrado la existencia de lesiones en neuronas catecolaminérgicas de la eminencia media y del lóbulo intermedio en ratas inyectadas previamente con 6-OHDA por vía endovenosa.

La administración de 6-OHDA en los ventrículos cerebrales destruye las fibras nerviosas catecolaminérgicas y provoca la depleción de catecolaminas.¹⁴ La administración sistémica de 6-OHDA a animales neonatos por vía subcutánea destruye también las terminaciones noradrenérgicas en la corteza cerebral y produce disminución irreversible del contenido de noradrenalina en la corteza.¹⁵ Las inyecciones seriadas intraperitoneales de 6-OHDA en ratas adultas preñadas provoca una disminución significativa del contenido cerebral de noradrenalina,⁶ lo cual es evidencia de la acción de esta droga y, por tanto, de su captación por el cerebro.

En este trabajo seguimos el esquema de administración de 6-OHDA utilizado por *MacDonald y Airaskiner*⁶ y no pudimos hallar efecto alguno de la droga sobre la actividad LPL cerebral. Es más, la 6-OHDA no ejerció efecto sobre la enzima *in vitro*, lo cual sugiere que la LPL cerebral de ratón se comporta en modo diferente a la LPL cardíaca de ratón¹ en presencia de 6-OHDA.

Como la inyección de 6-OHDA en la cisterna magna produce una disminución de la actividad LPL cardíaca en conejos,² aparte de otros posibles efectos citotóxicos provocados por la droga cuando se administra en cisterna magna,¹⁶ estos resultados sugieren la diversidad de respuestas exhibida por la LPL cerebral después de la administración de 6-OHDA. Esta diversidad de respuestas pudiera deberse a: a) diferencia entre especies, b) la vía de administración de la droga c) heterogeneidad de respuestas de acuerdo con la(s) región(es) afectada(s) en el sistema nervioso central,¹⁷ y d) una diferencia estructural importante entre las LPL de cerebro y corazón, sugerida por un comportamiento diferente de la enzima cardíaca en este trabajo, que reproduce resultados obtenidos antes,¹ donde una dosis única de 6-OHDA provocó retención de la actividad LPL cardíaca después de la inyección de heparina, como lo mostró una actividad significativamente mayor de la LPL cardíaca ($p < 0,05$) en animales inyectados con 6-OHDA y heparina, comparada con la actividad enzimática en animales inyectados con heparina solamente. Esta posible diferencia estructural parece ser apoyada por la falta de respuesta de la LPL cerebral a la heparina *in vivo* e *in vitro*, informada en el trabajo precedente.¹⁸

Reconocimiento

Apreciamos altamente la labor técnica de la compañera Ana Maltas.

SUMMARY

Lavín Palmieri, M.; D. Sánchez Serrano: *Cerebral lipoprotein lipase. II. Absence of response to 6-hydroxydopamine administration in the mouse.*

Effect of serial administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on activity of cerebral lipoprotein lipase (LPL) in the mouse was investigated. Intraperitoneal injection of four doses (one weekly) of 6-OHDA, 100 mg/kg of weight, neither produced effect on activity of cerebral LPL nor changes in enzymatic depletion of cerebrum by heparin administration (intraperitoneal 100 U/kg of weight). 6-OHDA neither exerted effect on activity LPL *in vitro*. There was a significant retention ($p < 0,05$) of activity of heart LPL after heparin administration to animals previously injected with 6-OHDA. Existence of important structural differences between heart and cerebral LPL is suggested.

RÉSUMÉ

Lavín Palmieri, M.; D. Sánchez Serrano: *Upase de lipoprotéines dans le cerveau. II. Absence de réponse à l'administration de 6-hydroxydopamine chez la souris.*

Il a été recherché l'effet de l'administration sériée de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) sur l'activité de lipase de lipoprotéines (LPL) cérébrale chez la souris. L'injection intrapéritonéale de 4 doses (une par semaine) de 6-OHDA, 100 mg/kg de poids, n'a pas eu d'effet sur l'activité de LPL cérébrale, ni a produit de changements dans la déplétion enzymatique du cerveau par l'administration d'héparine (100 U/kg de poids, par voie intrapéritonéale). La 6-OHDA n'a pas exercé non plus d'effet sur l'activité LPL cérébrale *in vitro*. Il y a eu une rétention significative ($p < 0,05$) d'activité LPL dans le coeur après l'administration d'héparine chez des animaux injectés au préalable avec 6-OHDA. Les auteurs suggèrent l'existence de différences structurales importantes entre les LPL de cerveau et de coeur.

BIBLIOGRAFIA

1. *Lavín Palmieri, M.*: Effect of 6-hydroxydopamine on heart lipoprotein lipase activity in mice. *Cor Vasa* (aceptado para publicación).
2. *Lavín Palmieri, M. et al.*: Effect of hypothalamic ventromedial nucleus electric stimulation and 6-hydroxydopamine on cardiac lipoprotein lipase activity in rabbits. *Cor Vasa* 25 : 73, 1983.
3. *Gilman, A. G. et al.*: The pharmacological basis of therapeutics. MacMillan, 1980. P. 205.
4. *Thoenen, H.; J. P. Tranzer*: The pharmacology of 6-hydroxydopamine. *Ann Rev Pharmacol* 13: 169, 1973.
5. *Gardiner, S. M.; T. Bennett*: The effect of peripherally administered 6-hydroxydopamine on food and water intake in rats. *Med Biol* 56: 156, 1978.
6. *MacDonald, E.; M. M. Alraksinen*: Studies on the mechanism of action of the abortive effect of 6-hydroxydopamine in rats. *Med Biol* 59: 111, 1981.
7. *Lavín Palmieri, M.; D. Sánchez-Serrano*: Effect of colchicine on heart lipoprotein lipase. *Cor Vasa* 25: 147, 1983.
8. *Lavín Palmieri, M.*: Lipasa de lipoproteínas: aplicación de un método para su determinación en tejido cerebral. *Rev Cub Med* 24: 271, 1985.
9. *Dole, V. P.; H. Melhertz*: Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissue. *J Biol Chem* 235: 2595, 1960.
10. *Salaman, M. ff.; D. S. Robinson*: The effect of fasting on the clearing factor lipase activity of rat adipose tissue and plasma. *In Enzymes of lipid metabolism*. New York, Pergamon Press, 1961. P. 218.
11. *Haeusler, G.*: Early pre- and post junctional effects of 6-hydroxydopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 170: 50, 1971.
12. *Toomey, R. E.*: Alpha₂-adrenoreceptor affinity of some inhibitors of norepinephrine N-methyltransferase. *Life Sciences* 29: 2467, 1982.

13. *Smith, G. C. et al.*: Effect of 6-hydroxydopamine lesions of the median eminence and neurointermediate lobe on the secretion of pituitary hormones in the male rat. *Brain Res* 246: 330, 1982.
14. *Reader, T. A.*: Catecholamines and serotonin in rat frontal cortex after PCPA and 6-OHDA: absolute amounts and ratios. *Brain Res Bull* 8: 527, 1982.
15. *Dausse, J. P. et al.*: Effect of neonatal 6-hydroxydopamine treatment on alpha₁- and alpha₂-adrenoceptors in rat cerebral cortex. *J Cardiovasc Pharmacol* 4: S86, 1982.
16. *Ebersole, P. et al.*: Development of the visual cortex of rats treated with 6-hydroxy-dopamine in early life. *Anat Embryol* 162: 489, 1981.
17. *Lovell, K. L.*: Changes in brain norepinephrine contents in mice following neonatal 6-hydroxydopamine. *Brain Res Bull* 7: 41, 1981.
18. *Lavín-Palmieri, M.; D. Sánchez Serrano*: Lipasa de lipoproteínas en cerebro. I. Efecto de la colchicina *in vivo* e *in vitro* sobre la actividad de la enzima en rata. *Rev Cub Med* [enviado a publicación].

Recibido: 17 de marzo de 1986

Aprobado: 17 de abril de 1986

Dr. *Marcelino Lavín Palmieri*

Calle 17 No. 702 esq. A, Vedado, Plaza de la Revolución

Ciudad de La Habana

Cuba