

CONCENTRACION DE HALOPERIDOL-H³ EN FRACCIONES SUBCELULARES DE CEREBRO DE RATA DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE DOSIS FARMACOLOGICAS DE LA DROGA

E. Ryder*, E. Luengo de Borges** y G. Campos*

* Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina. ** Escuela de Biología. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia, Apartado 1151. Maracaibo 4001-A, Venezuela.

RESUMEN

Se determinó, en ratas adultas, la distribución subcelular de haloperidol-H³ en dos regiones cerebrales, después de la administración de 2-2,8 mg/kg de la droga marcada.

Los niveles obtenidos en el homogeneizado total están acordes con los valores reportados por otros autores usando el mismo método isotópico o el de los radioreceptores. Después del fraccionamiento subcelular observamos que la concentración de la droga fué similar en los diferentes compartimientos, tanto en la corteza como en el estriado. Sin embargo, los niveles alcanzados, menos de 0,5 micromolar, podrían explicar la falta de inhibición de la dehidrogenasa glutámica que había sido observada después de la administración in vivo de dosis farmacológicas de la droga, ya que la concentración inhibitoria efectiva in vitro es prácticamente diez veces mayor.

INTRODUCCION

Algunas drogas que afectan el comportamiento, tales como la clorpromazina, derivados de las fenotiazidas y el haloperidol, son *in vitro* inhibidores de la dehidrogenasa glutámica (EC 1.4.1.2, GDH) (7), enzima sintetizadora del glutamato y cuya actividad en cerebro es muy alta. La inhibición producida por estas drogas es debida, aparentemente, a su fijación sobre la enzima en un sitio distinto del activo. Ya que esta fijación incrementa el espectro de absorción y disminuye la fluorescencia y el coeficiente de sedimentación de la enzima, se cree que la inhibición es secundaria a un cambio conformacional de la proteína enzimática (2).

A pesar del efecto inhibitorio observado *in vitro*, estudios *in vivo* realizados por nosotros, no demuestran ningún efecto del haloperidol sobre la actividad de la dehidrogenasa glutámica en cerebro o en hígado de rata (6), cuando se usan dosis farmacológicas de esta droga. Esta falta de efecto podría ser atribuída a que la asociación de esta enzima con otras, como la L-aspartato-2-oxoglutarato amino transferasa, forma un complejo enzima-enzima que previene la modificación conformacional que conduce a la inhibición, tal como ha sido sugerido por Shemisa y Fahien (8), o a que no se logren alcanzar niveles tisulares suficientes de la droga como para provocar la inhibición.

Janssen y Allewijn han descrito con bastante detalle la distribución y metabolismo de las drogas neurolépticas en cerebro de rata (4). Basados en estos estudios nos propusimos medir la concentración de haloperidol en las mitocondrias, compartimiento subcelular donde está localizada la dehidrogenasa glutámica, después de la administración de dosis farmacológicas de esta droga.

MATERIAL Y METODOS

Se usaron ratas adultas de la cepa Sprague-Dawley de 250-350 g de peso. La droga usada fue haloperidol (Haldol, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica), la cual se mezcló con haloperidol H³-G (New England Nuclear, Boston, USA) de tal forma que la solución a ser inyectada tenía una concentración final de 3,4 mg/ml, una actividad específica de 5,26 microcuries por micromol y un pH de 5-5,2. Cada animal recibió, por vía ip, 10 microcuries de esta solución, lo que correspondía aproximadamente a 2-2,8 mg/kg de peso, y se sacrificaron por decapitación a una y dos horas después de la inyección. El procedimiento experimental de disección y fraccionamiento subcelular fue similar al descrito por Luengo-Borges

y col (6). De cada una de las fracciones aisladas (núcleos y restos celulares, postmitocondrial y mitocondrial) se contaron alícuotas de 100 microlitros, con 10 ml de Aquasol-2 (NEN) en espectrómetro de centelleo líquido LKB Wallac, con una eficiencia para tritio del 53% (1, 4).

Los resultados se expresan en nanomoles por ml de suspensión (mM) o por mg de proteína. La determinación de proteínas se hizo por el método de Lowry y col (5). Para el análisis estadístico se aplicó el test de Student.

RESULTADOS

Los resultados presentados en la Tabla I, muestran que, tanto en corteza como en estriado, la concentración de haloperidol es menor de 0,5 micromolar, en cualquiera de las fracciones subcelulares. Expresada en mg de proteína, está en el orden de los 20-40 picomoles por mg, también en cualquiera de las fracciones. Expresado en nanomoles por gramo de tejido fresco, la concentración en los homogeneizados estaría en el orden de 2-4, valores similares a los obtenidos por Campbell y col para cerebro total usando el método de los radioreceptores (1).

También pudimos observar que la variación en la concentración de la droga con el tiempo obtenida en los homogeneizados, es reflejo de una disminución en los restos celulares, no observándose variación significativa ni en la fracción postmitocondrial ni en la mitocondrial, en ninguna de las zonas estudiadas.

La distribución porcentual de la radioactividad total en las diferentes fracciones se mantuvo constante por el período de tiempo estudiado, a excepción de la fracción post-mitocondrial de la corteza donde se observó un aumento significativo a las 2 horas (Tabla II). El porcentaje de recuperación de la radioactividad en estas fracciones subcelulares fue un 80% de la obtenida en el homogeneizado total.

DISCUSION

Los estudios de inhibición *in vitro* de la DGH por el haloperidol reportan concentraciones efectivas en el medio de ensayo de 10-100 micromolar. Chee y col (2), usando enzima purificada de cerebro de rata, obtienen un 50% de inhibición, con una concentración 10 micromolar equivalente a 50 picomoles por mg de proteína. Collins reporta, con la enzima purificada comercial, una inhibición de un 40%, usando una concentración 100 micromolar de haloperidol en el medio de incubación (3). Nosotros, en estudios *in vitro*, realizados con fracción mitocondrial cruda de cerebro

TABLA I
CONCENTRACION DE HALOPERIDOL-³H EN DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES
DE CEREBRO DE RATA

Fracción	Corteza		Estríado					
	1 h. nmol/ml	2 h. nmol/mg prot.	1 h. nmol/ml	2 h. nmol/mg prot.				
Homogeneizado total	0.462 (0.066)	0.042 (0.006)	0.229* (0.071)	0.027 (0.006)	0.356 (0.085)	0.036 (0.006)	0.390 (0.136)	0.024* (0.001)
Núcleos y Restos Celulares	0.226 (0.023)	0.036 (0.011)	0.151* (0.022)	0.020 (0.003)	0.146 (0.043)	0.041 (0.001)	0.086 (0.021)	0.016* (0.002)
Post-Mitocondrial	0.130 (0.031)	0.040 (0.009)	0.159 (0.033)	0.042 (0.010)	0.135 (0.028)	0.040 (0.010)	0.081 (0.012)	0.021 (0.004)
Mitocondrial	0.313 (0.088)	0.039 (0.007)	0.199 (0.052)	0.025 (0.006)	0.157 (0.043)	0.027 (0.008)	0.134 (0.045)	0.023 (0.005)

Los resultados representan el promedio (\pm E.S.) de 2-5 determinaciones.

* $p < 0.05$ con respecto a 1 hora.

TABLA II

DISTRIBUCION DE LA RADIOACTIVIDAD TOTAL EN LAS
DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES

	Corteza		Estriado	
	1 h.	2 h.	1 h.	2 h.
Homogeneizado total	100	100	100	100
Restos Celulares	39 ± 3	33 ± 6	42 ± 4	39 ± 1
Fracción Post-Mitocondrial	35 ± 3	42 ± 2*	32 ± 4	31 ± 4
Mitocondrias	26 ± 0.5	25 ± 4	26 ± 5	28 ± 4

Los valores representan el promedio ± E.S. de 4 experimentos.

* $p < 0.05$ en relación al tiempo inmediatamente anterior.

de rata, conseguimos un 60% de inhibición, usando una concentración 20 micromolar y en una proporción de aproximadamente 40 micromoles por mg de proteína enzimática (6).

Al obtener, *in vivo*, niveles inferiores a 1 micromolar en la suspensión mitocondrial, correspondiente a una concentración de apenas 40 picomoles por mg de proteína mitocondrial, es explicable la falta de inhibición de la GDH observada por nosotros después de la administración de dosis farmacológicas de haloperidol (6).

La elevación de los niveles del ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y del ácido homovanílico (HVA) reportados por Wilk y col en el estriado de ratas tratadas con haloperidol (9), se manifiesta a dosis muy bajas de la droga. Con 0,25 mg/kg de peso, el incremento fue de 250% para DOPAC y 350% para HVA, dos horas después de la administración de la droga. Por lo tanto, la concentración de la droga, efectiva para afectar el metabolismo de la dopamina, sería bastante inferior a la necesaria para inhibir la GDH.

Los experimentos de Janssen y Allewijn (4) y Campbell y col (1) revelan, que si se eleva progresivamente la dosis de haloperidol, se obtiene un aumento proporcional de la concentración cerebral de la droga. Así, para alcanzar una concentración de 10 micromolar, efectiva para inhibir la enzima, tendríamos que administrar al animal una dosis 10 veces superior a las dosis farmacológicas de haloperidol.

La disminución de la concentración de la droga a la mitad, observada en los homogeneizados totales a las 2 horas, concuerda con los resultados de Janssen y Allewijn para cerebro total (4). Nosotros demostramos que esta caída se produce a expensas de una disminución de la fracción de los restos celulares, ya que en las otras fracciones no se modifica en forma significativa en dicho período de tiempo.

La distribución porcentual de la radioactividad total en las diferentes fracciones se mantuvo constante, a excepción de la fracción post-mitocondrial de la corteza donde se observó un ligero incremento. Esta modificación en la distribución porcentual a nivel de la fracción postmitocondrial parece ser realmente importante, ya que, resultados preliminares obtenidos al repetir las inyecciones de la droga marcada hasta por 4 días consecutivos, siguiendo el esquema de tratamiento crónico de nuestro trabajo anterior (6) nos muestran que al 5º día, habiendo pasado 24 horas después de la última inyección, existe un incremento de la radioactividad por mg de proteína en ambas zonas del cerebro, a expensas de la fracción post-mitocondrial, la cual presenta ahora un 75% del total presente en el homogeneizado total; la fracción de los restos celulares representa un 17% y en las mitocondrias aparece solo un 10%.

Janssen y Allewijn (4) encuentran que la proporción de la droga que no es metabolizada depende de la dosis usada: a menor concentración, menor velocidad de transformación. Para una dosis cercana a la usada por nosotros (2,5 mg/kg de peso) la proporción de la droga no metabolizada a la hora, en el cerebro, alcanzó a un 70% y a las 16 horas es aún de un 50%, aunque en otros órganos, como en el hígado, ésta se metaboliza más rápidamente llegando a un 50% en apenas 4 horas (4). Por lo tanto, la distribución de la radiactividad reportada en este trabajo, probablemente corresponda en muy buena proporción a droga no metabolizada.

ABSTRACT

³H-Haloperidol concentration in rat brain subcellular fractions after the administration of pharmacological doses of the drug. *Ryder E., (Instituto de Investigaciones Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Apartado 1151. Maracaibo 4001-A, Venezuela), Luengo Borges E., Campos G. Invest Clín 23(1): 23-29, 1982.*— The subcellular distribution of ³H-haloperidol in two brain regions was determined after administration of 2-2.8 mg/kg of the labelled drug to adult rats. Levels attained for the crude homogenate are in accordance with the values reported by other authors using either the same isotopic method or the radioreceptors assay. After the subcellular fractionation, we observed that the concentration

of the drug was similar in the different compartments, in the cortex as well as in the striatum. However, the low level reached, less than one micromolar, might explain the lack of inhibition of glutamate dehydrogenase observed after the *in vivo* administration of pharmacological doses of the drug.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- CAMPBELL A, HERSCHEL M, COHEN BM, BALDESSARINI RJ: Tissue levels of haloperidol by radioreceptor assay and behavioral effects of haloperidol in the rat. *Life Sciences* 27: 633-640, 1980.
 - 2- CHEE PY, DAHL JL, FAHIEN LA: The purification and properties of rat brain glutamate dehydrogenase. *J Neurochem* 33: 53-60, 1979.
 - 3- COLLINS GCS: Effect of aminooxyacetic acid, thiosemicarbazide and haloperidol on the metabolism and half lives of glutamate and GABA in rat brain. *Biochem Pharmacol* 22: 101-111, 1973.
 - 4- JANSSEN PAJ, ALLEWIJN FTN: The distribution of the butyrophenones haloperidol, trifluoperidol, moperone and clofluperol in rats, and its relationship with their neuroleptic activity. *Arznei-mittel-Forsch* 19: 199-208, 1969.
 - 5- LOWRY O, ROSEBROUGH N, LEWIS A, RANDALL R: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
 - 6- LUENGO-BORGES E, RYDER E, CAMPOS G: Lack of effect on glutamate dehydrogenase activity after *in vivo* administration of pharmacological doses of haloperidol. *Biochem Pharmacol* 31: 1446-1448, 1982.
 - 7- SHEMISA OA, FAHIEN LA: Modifications of glutamate dehydrogenase by various drugs which affect behavior. *Molec Pharmacol* 7: 8-25, 1970.
 - 8- SHEMISA OA, FAHIEN LA: Effects of tranquilizers on the glutamate dehydrogenase-glutamate oxalacetate transaminase complex. *Molec Pharmacol* 9: 726-735, 1973.
 - 9- WILK S, WATSON E, STANLEY M: Differential sensitivity of two dopaminergic structures in rat brain to haloperidol and to clozapine. *J Pharmacol Exp Ther* 195: 265-270, 1975.
-