

Interacción entre péptidos opioides y sistema dopaminérgico en el plexo mientérico de íleon de cobaya

J. A. Martínez, M. L. Vargas y M. V. Milanés*

Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina
Murcia (España)

(Recibido el 2 de junio de 1986)

J. A. MARTINEZ, M. L. VARGAS and M. V. MILANES. *Possible Interaction Between Opioid Peptides and Dopaminergic System in the Myenteric Plexus of Guinea-Pig Ileum*. *Rev. esp. Fisiol.*, 43 (2), 173-178, 1987.

The effects of treatment with dopamine agonists and 6-hydroxydopamine on the release of opioid peptides from the myenteric plexus of guinea-pig ileum were examined. Apomorphine or bromocryptine treatment at doses that act on dopamine autoreceptors to inhibit dopamine release resulted in a significant elevation of the release of opioid peptides. 6-hydroxydopamine treatment, which produces a lesion of catecholaminergic nerve terminals also resulted in an increase in opioid peptide release. These findings indicate that interruption of dopaminergic transmission in the myenteric plexus produces an increase in the release of opioid peptides and suggest an inhibitory modulation of opioid peptidergic neurons by dopamine systems in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum.

Key words: Opioid peptides, Myenteric plexus, Apomorphine, Bromocryptine, 6-Hydroxydopamine.

La presencia de péptidos opioides en el plexo mientérico de íleon de cobaya y su liberación por estímulo eléctrico son hechos conocidos desde hace tiempo (4, 12). Sin embargo, en la actualidad, se desconoce tanto el posible papel fisiológico de estos péptidos a nivel del tracto gastrointestinal como los factores que regulan su biosíntesis y liberación.

A nivel del sistema nervioso central se ha demostrado que el tratamiento crónico con bloqueantes dopaminérgicos, como

haloperidol, produce un incremento en la biosíntesis y, por tanto, en los niveles de met-enkefalina en el estriado de la rata (6, 7), debido, quizás, a un estímulo del RNA mensajero para proencefalina (2, 20).

Recientes trabajos han demostrado que el tratamiento agudo o crónico con diferentes neurolepticos, tales como haloperidol, clozapina o sulpiride, produce un incremento en la liberación de péptidos opioides en el plexo mientérico de íleon de cobaya, que parece ser debido a un incremento de su biosíntesis, ya que el tratamiento con cicloheximida bloquea el

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

incremento en la liberación de estos péptidos, en los animales tratados con cualquiera de los neurolépticos mencionados (8, 9). Estos resultados indican que el bloqueo de receptores de dopamina produce un aumento en la biosíntesis y liberación de péptidos opioides en el plexo y que, por tanto, las neuronas opioides estarían moduladas funcionalmente por sistemas dopaminérgicos.

Aunque hasta el momento no se ha demostrado la existencia de neuronas dopaminérgicas en los nervios entéricos, existen numerosos trabajos que sugieren que la dopamina podría actuar como un neurotransmisor en el tracto gastrointestinal (10, 11, 21). En el presente estudio se ha intentado confirmar la posible existencia de una interacción funcional entre péptidos opioides y sistema dopaminérgico en el plexo miéntérico de cobaya, para lo cual se ha examinado el efecto del tratamiento crónico con agonistas dopaminérgicos, así como el efecto de la destrucción de las terminaciones catecolaminérgicas por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), sobre la liberación de péptidos opioides a ese nivel.

Material y Métodos

Se utilizaron cobayas tricolor (350-500 g) y los experimentos se llevaron a cabo en la preparación músculo longitudinal-plexo miéntérico (MLPM) de íleon (9). La preparación MLPM se colocó en un baño de órgano aislado de 2 ml que contenía Krebs bicarbonatado a 37° C burbujeado con carbógeno, fue estimulada (estimulador Grass) mediante dos electrodos circulares de platino, con impulsos rectangulares de 1 ms de duración, voltaje supramaximal (40 V), a una frecuencia basal de 0,2 Hz. Para producir liberación de péptidos opioides se elevaba la frecuencia de estimulación a 10 Hz durante 30 s. Al ser restaurada la frecuencia basal de estimulación, aparece una respuesta

inhibitoria (RI) cuyo principal componente es debido a la liberación de estos péptidos (13), ya que dicha respuesta es revertida por naloxona en gran proporción. Los períodos de estimulación a alta frecuencia se repitieron 5 veces, y cinco minutos antes de la quinta estimulación se añadió al baño naloxona (5×10^{-7} M) en un volumen de 0,1 ml. Los valores de las RI y de su inversión por naloxona fueron calculados mediante el procedimiento de PUIG *et al.* (12).

Tratamientos. — Grupo 1: Cobayas tratados con apomorfina (2 ó 5 mg/kg/día) o con solución fisiológica (controles), por vía s.c. durante 4 días. Grupo 2: Animales tratados con bromocriptina (7 ó 15 mg/kg/día) por vía i.p. durante 4 días. La bromocriptina fue disuelta en etanol 70° conteniendo ácido tartárico al 1% y diluida en solución fisiológica. El grupo control recibió etanol 70° conteniendo ácido tartárico al 1% diluido en solución fisiológica. Estos dos grupos experimentales fueron diseñados para determinar si el estímulo de los receptores pre o postsinápticos de dopamina modificaba la liberación de péptidos opioides en el plexo. Grupo 3: Animales tratados con 100 mg/kg i.p. de 6-OHDA cada 4 días por un total de 16 días. La 6-OHDA se disolvió en suero fisiológico que contenía ácido ascórbico al 1%. El grupo control recibió ácido ascórbico disuelto en solución salina (i.p.), administrado a igual secuencia. Grupo 4: Los cobayas fueron tratados con 6-OHDA (100 mg/kg i.p.) cada 4 días, por un total de 16 días, y los cuatro últimos días recibieron, además, haloperidol i.p. (5 mg/kg/día). El grupo control fue tratado con ácido ascórbico al 1% disuelto en salino (i.p.), cada 4 días por un total de 16 días, y los 4 últimos días se les inyectó además haloperidol i.p. (5 mg/kg/día).

Los fármacos utilizados fueron: apomorfina clorhidrato (Sigma); bromocriptina mesilato (Sandoz); 6-hidroxidopami-

na bromhidrato (Sigma); haloperidol (Latino); naloxona clorhidrato (Abelló).

El estudio estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza doble, asociado al test de la T de Student para datos no apareados. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. y se consideró que un valor era significativo si $p < 0,05$.

Resultados

Efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre la RI. — El tratamiento con la dosis baja de apomorfina (2 mg/kg), produjo una RI ($54,4 \pm 2\%$) que fue significativamente superior ($p < 0,01$) que la obtenida en el grupo control ($46,4 \pm 1,8\%$). En ambos casos la RI fue invertida por naloxona, siendo la inversión de $62,9 \pm 1,8\%$ en el grupo experimental y de $50 \pm 5,6\%$ en el grupo control (fig. 1a). Por el contrario, tras la administración de apomorfina a una dosis más alta (5 mg/kg), no se observaron diferencias entre la RI de este grupo ($49,3 \pm 2,6\%$) y el control. La inversión de la RI por naloxona fue de $58,3 \pm 3,4\%$ (fig. 1a).

La administración de bromocriptina a una dosis baja (7 mg/kg) produjo una RI

($46,6 \pm 1,8\%$) que no fue significativamente diferente de la del grupo control ($50,7 \pm 3,3\%$). En presencia de naloxona la respuesta fue revertida en ambos grupos, siendo la inversión de $50,4 \pm 4,4\%$ en el grupo experimental y de $45,9 \pm 8,5\%$ en el grupo control (fig. 1b). Cuando se realizó el tratamiento con una dosis elevada de bromocriptina (15 mg/kg), se produjo un incremento significativo ($p < 0,001$) de la RI ($74,8 \pm 1,6\%$) respecto al control. La inversión por naloxona de la RI de este grupo experimental fue de $60,6 \pm 1,4\%$ (figura 1b).

Efecto de la 6-OHDA sobre la RI. — Cuando los cobayas fueron tratados con 6-OHDA se produjo una RI ($57,6 \pm 2,5\%$) significativamente mayor ($p < 0,001$) que la obtenida en el grupo control ($46,9 \pm 1,1\%$). La RI fue revertida en ambos casos por naloxona siendo la inversión de $70 \pm 4,6\%$ en el grupo experimental y de $50,3 \pm 8,6\%$ en el control (fig. 2a).

Efecto de la 6-OHDA sobre el incremento de la RI producido por el haloperidol. — La denervación producida por la 6-OHDA modificó significativamente

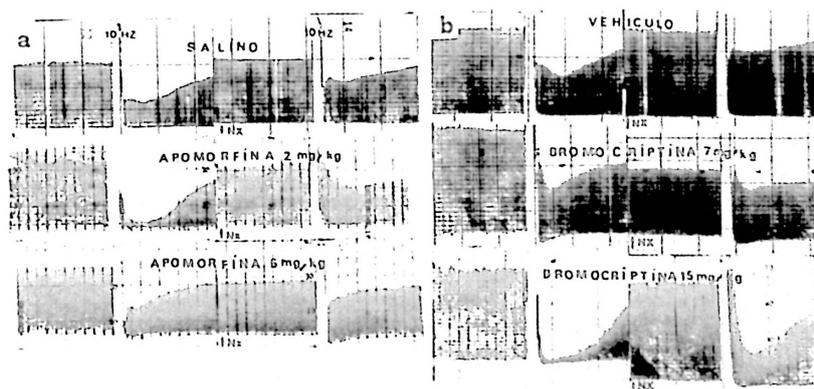


Fig. 1. Respuestas inhibitorias por la estimulación eléctrica (10 Hz) de la preparación MLPM (izquierda) y su inversión por naloxona 5×10^{-7} M (derecha) cuando los cobayas fueron tratados con apomorfina (2 ó 5 mg/kg) o suero fisiológico durante 4 días (A) y con bromocriptina (7 ó 15 mg/kg) o vehículo durante 4 días (B).

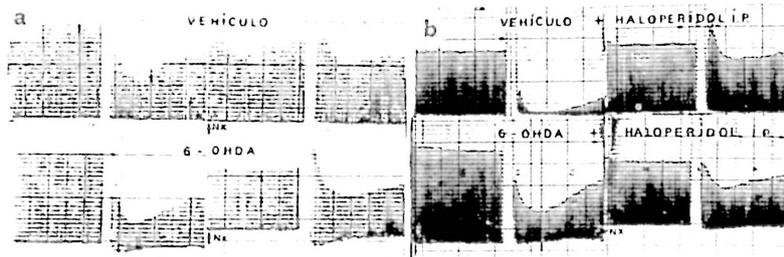


Fig. 2. Respuesta inhibitoria por la estimulación eléctrica (10 Hz) de la preparación MLPM (izquierda) y su inversión por naloxona 5×10^{-7} M (derecha).

(A) cobayas tratados con 6-OHDA (100 mg/kg) o vehículo cada 4 días durante 16 días. (B) cobayas tratados con 6-OHDA (100 mg/kg) o vehículo cada 4 días, durante 16 días, recibiendo los 4 últimos días haloperidol (5 mg/kg).

($p < 0,001$) el efecto del haloperidol sobre la RI, que fue de $58,6 \pm 2,2\%$ en el grupo tratado con 6-OHDA más haloperidol y de $64,9 \pm 1,7\%$ en el grupo que recibió solamente haloperidol. La inversión por naloxona fue de $49,9 \pm 5\%$ en el grupo experimental y de $67 \pm 5,8\%$ en el grupo control (fig. 2b).

Discusión

Este estudio confirma y explica resultados previos (8, 9) sobre la posible existencia de una interacción funcional entre péptidos opioides y sistemas dopaminérgicos en el plexo mientérico de ileon de cobaya, y muestra que dependiendo de la dosis, los agonistas dopaminérgicos pueden modificar la liberación de péptidos opioides en el plexo.

El tratamiento con apomorfina a dosis baja, produce incremento de la RI obtenida por estimulación eléctrica de la preparación MLPM, debido a un aumento en la liberación de estos péptidos ya que la RI es revertida por naloxona. Sin embargo, cuando la dosis de apomorfina es más elevada no se observan modificaciones. Estudios electrofisiológicos y bioquímicos han demostrado que dosis bajas de apomorfina estimulan selectivamente los receptores dopaminérgicos presinápticos, mientras que dosis más elevadas estimu-

lan selectivamente los receptores dopaminérgicos postsinápticos (3, 17, 18). Estos resultados parecen indicar que el incremento en la liberación de péptidos opioides que se produce tras el tratamiento con dosis pequeñas de apomorfina podría ser consecuencia de la estimulación de los autorreceptores de dopamina por el fármaco.

Cuando los animales son tratados con bromocriptina, sólo con la dosis alta se produce incremento en la liberación de péptidos opioides en el plexo, resultados que están de acuerdo con los obtenidos con apomorfina, ya que el autorreceptor dopaminérgico es menos sensible a la bromocriptina que el postsináptico y, por tanto, sólo las dosis altas estimularán a los autorreceptores (16, 18), sugirieron por ello que el incremento de la liberación de péptidos opioides tras el tratamiento con dosis elevadas de bromocriptina, sería debido al estímulo de los autorreceptores de dopamina.

Diferentes estudios han demostrado que los receptores dopaminérgicos presinápticos tienen un papel inhibitorio sobre la biosíntesis y liberación de dopamina (1, 5). Por todo ello los resultados aquí expuestos sugieren que el tratamiento con dosis pequeñas de apomorfina, o con dosis elevadas de bromocriptina, podrían inhibir la liberación de dopamina en el plexo mientérico. Esta posi-

ble interrupción de la biosíntesis dopaminérgica podría entonces producir un incremento en la liberación de péptidos opioides en el plexo, y como consecuencia la liberación de péptidos opioides del plexo mientérico estaría regulada por neuronas dopaminérgicas de tipo inhibitorio.

Estudios previos han demostrado la existencia de interacciones entre péptidos opioides y dopamina en el Sistema Nervioso Central y Periférico. Así, el tratamiento crónico con diferentes neurolépticos produce un incremento en los niveles de metionina-enkefalina en el estriado de la rata, lo que sugiere que la biosíntesis en este péptido estaría bajo control de tipo inhibitorio por neuronas dopaminérgicas (7). Interacciones similares a ésta se ha encontrado también entre dinorfina y dopamina en los ganglios basales de la rata (14). En estudios recientes se ha demostrado un incremento de la biosíntesis y liberación de péptidos opioides en el plexo mientérico tras el tratamiento con diferentes antagonistas dopaminérgicos (8, 9). Todos estos resultados están de acuerdo con el presente estudio, e indican que la dopamina estaría involucrada en el control fisiológico de la actividad de neuronas opioides. Esta posible modulación de los péptidos opioides por neuronas dopaminérgicas es demostrada además, por el hecho de que la degeneración de las terminaciones catecolaminérgicas por 6-OHDA produce un incremento en la liberación de estos péptidos en el plexo, lo que concuerda con otros trabajos realizados en el Sistema Nervioso Central, donde la inyección de 6-OHDA en la sustancia negra produce un incremento en los niveles de metionina-enkefalina (19).

Como el tratamiento con 6-OHDA incrementa de igual forma que el haloperidol la liberación de péptidos opioides en el plexo, se pensó que la denervación y el bloqueo de receptores dopaminérgicos tendría un efecto aditivo sobre la liberación de estos péptidos. Sin embargo, los

resultados muestran que no se produce este efecto aditivo, sino que el haloperidol es más efectivo incrementando la liberación, debido quizás a que el tratamiento con haloperidol produce ya el máximo efecto sobre la liberación de estos péptidos opioides, por lo que no necesariamente la administración de 6-OHDA incrementará ese efecto.

La existencia de receptores y neuronas dopaminérgicas en el tracto gastrointestinal está todavía en estudio. Sin embargo, en recientes estudios farmacológicos se ha postulado la existencia de receptores específicos de dopamina a ese nivel (22), la existencia de neuronas dopaminérgicas (11) o que la dopamina podría ser el neurotransmisor inhibitorio liberado por neuronas entéricas (21). Teniendo en cuenta todos estos hallazgos, los resultados del presente trabajo sugieren la posibilidad de que existan neuronas dopaminérgicas en el plexo mientérico del íleon de cobaya. Como conclusión, el presente estudio muestra que la liberación de péptidos opioides del plexo mientérico estaría regulada por sistemas dopaminérgicos, ya que la interrupción de la transmisión dopaminérgica por diferentes métodos, produce modificaciones en la liberación de estos péptidos a ese nivel. Se propone por ello la existencia de una modulación de tipo inhibitorio de la liberación de péptidos opioides por dopamina.

Agradecimientos

Al Dr. D. Pérez, del Departamento de Bioestadística, su colaboración en el estudio estadístico de los resultados, y a los Laboratorios Sandoz, Latino y Abelló el suministro gratuito de bromocriptina, naloxona y haloperidol, respectivamente.

Resumen

Se estudian los efectos del tratamiento crónico con agonistas dopaminérgicos y 6-OHDA sobre la

liberación de péptidos opioides en el plexo mientérico del ileon de cobaya. El tratamiento con apomorfina o bromocriptina a dosis que actúan preferentemente sobre autorreceptores dopaminérgicos produce un incremento significativo de la liberación de estos péptidos. El tratamiento con 6-OHDA, que lesiona las terminaciones catecolaminérgicas, produce también un incremento en la liberación de péptidos opioides. Estos resultados indican que la interrupción de la neurotransmisión dopaminérgica en el plexo mientérico produce un incremento en la liberación de estos péptidos y sugieren la existencia de una modulación de tipo inhibitorio de las neuronas opioides por la dopamina en el plexo mientérico del ileon de cobaya.

Palabras clave: Péptidos opioides, Plexo mientérico, Apomorfina, Bromocriptina, 6-hidroxidopamina.

Bibliografía

- Bannon, M. J., Chiodo, L. A., Bunney, E. B., Wolf, M. E., Grace, A. A., Bunney, B. S. y Roth, R. H.: En «Catecholamines: Neuropharmacology and Central Nervous System. Theoretical aspects» (Usdin, T. H. *et al.*, eds.). Alan R. Liss, Nueva York, 1984, pp. 25-36.
- Blanc, D., Cupo, A., Castanas, E., Bourhim, N., Giraud, P., Bannon, M. J. y Eiden, L. E.: *Neuropéptides*, 5, 567-570, 1985.
- Di Chiara, G., Porceddu, M. L., Vargiu, L., Argiolas, A. y Gessa, G. L.: *Nature*, 264, 564-567, 1976.
- Furness, J. B. y Costa, M.: *Neuroscience*, 5, 1-20, 1980.
- Gonon, F. G. y Buda, M. J.: *Neuroscience*, 14, 765-774, 1985.
- Hong, J. S., Yang, H. Y. T., Fratta, W. y Costa, E.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 205, 141-147, 1978.
- Hong, J. S., Yang, H. Y. T., Gillin, J. C., Di Giulio, A. M., Fratta, W. y Costa, E.: *Brain Res.*, 160, 192-195, 1979.
- Milanés, M. V., Vargas, M. L., Martínez, J. A., Pérez, D. y Brugger, A. J.: *Regul. Peptides*, 10, 319-327, 1985.
- Milanés, M. V., Vargas, M. L. y Puig, M. M.: *J. Pharm. Pharmacol.*, 36, 446-449, 1984.
- Neef, N. H., Hadjiconstantinou, M. y Lackovic, Z.: En «Dopamine receptor agonists» (G. Poste y S. T. Crooke, eds). Plenum Press, Nueva York, 1984, pp. 179-194.
- Orloff, L. A., Orloff, M. S., Bunnett, N. W. y Walsh, J. H.: *Life Sci.*, 36, 1625-1631, 1985.
- Puig, M. M., Gascón, P., Craviso, G. L. y Musacchio, J. M.: *Science*, 195, 419-420, 1977.
- Puig, M. M., Gascón, P. y Musacchio, J. M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 206, 289-302, 1978.
- Quirion, R., Gaudreau, P., Martel, J. C., St-Pierre, S. y Zamir, N.: *Brain Res.*, 331, 358-362, 1985.
- Rebec, G. V. y Lee, E. H.: *Brain Res.*, 250, 188-192, 1982.
- Seeman, P.: *Pharmacol. Rev.*, 32, 229-313, 1980.
- Skirboll, L. R., Grace, A. A., Bunney, B. S.: *Science*, 206, 80-82, 1979.
- Sokoloff, P., Martres, M. P. y Schwartz, J. C.: *Nature*, 288, 283-286, 1980.
- Thal, L., Sharpless, N. S., Hirschorn, I. D., Horowitz, S. G. y Makman, M. H.: *Biochem. Pharmacol.*, 32, 3297-3301, 1983.
- Tang, F., Costa, E. y Schwartz, J. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80, 3841-3844, 1983.
- Valenzuela, J. E.: *Gastroenterology*, 71, 1019-1022, 1976.
- Van Nuetten, J. M. y Schuurkes, J. A. J.: *Scand. J. Gastroenterol.*, 19, 89-99, 1984.