

Valoración espectrofluorométrica de dopamina en pequeñas áreas de cerebro de rata

J. M. López-Novoa,* E. Martínez-Conde y A. Fraile

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid

(Recibido el 22 de marzo de 1976)

J. M. LOPEZ-NOVOA, E. MARTINEZ-CONDE and A. FRAILE. *Spectrofluorometric Determination of Dopamine in Small Areas of Rat Brain*. Rev. esp. Fisiol., 33, 5-10. 1977.

A method for the extraction and quantification of Dopamine from small areas of rat brain has been developed. The extraction with solvents eliminates the column chromatography separations and allows the simultaneous processing of a good number of samples. Sample retrieval is quite high (70 %) and very reproducible.

The evaluation was made from areas with a minimal weight of 0.225 g.

The quantification of Dopamine was obtained using spectrofluorometric techniques, reading the fluorescence of the trihydroxy indol derivate.

The linear relation between the instrument readings and the concentration of Dopamine is from 0 to 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

The maximal concentration of Dopamine was found in the decorticated cerebral hemispheres (1.485 $\mu\text{g/g}$), the next highest values in the diencephalon (1.046 $\mu\text{g/g}$), and the minimal concentration in the cerebellum (0.283 $\mu\text{g/g}$). The concentration of the whole brain was 0.701 $\mu\text{g/g}$.

Un paso indispensable en el estudio del papel que juegan las aminas biógenas en los mecanismos de comportamiento animal a nivel del sistema nervioso central es la puesta a punto de un método para su valoración en pequeñas áreas de tejido. Ese método debe ser altamente reproducible para poder diferenciar las pequeñas variaciones que sobre sus concentraciones

inducen los diversos estados del animal: nivel de agresividad, ciclos sexuales, etc.

La dopamina ha sido considerada durante muchos años como un simple producto metabólico intermedio, entre tirosina y dopa por una parte, y entre noradrenalina y adrenalina por otra, pero sin asignársele ningún papel específico.

CARLSSON (5) sugirió que la dopamina podía estar involucrada en el control de las funciones motoras, al observar que los ganglios basales y algunas de las estructuras asociadas tenían una elevada concentración de la amina. Al mismo tiempo

* Dirección actual: Departamento de Neurología, Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos, 2, Madrid - 3.

encontró en estas áreas una baja concentración de noradrenalina, lo que hizo que se empezara a abandonar la idea de que la única función de la dopamina era la de metabolito intermedio.

Se ha puesto a punto un método de extracción con disolventes, basado en el desarrollado por WELCH y WELCH (21), cuantificando la concentración de dopamina mediante la valoración espectrofluorométrica del derivado trihidroxiindólico, de forma similar a la descrita por CARLSSON y WALDECK (7). Permite valoraciones precisas en pequeñas piezas de tejido, y puede aplicarse a la vez a un número elevado de muestras, lo que permite el estudio simultáneo de grupos homogéneos de animales, como camadas.

Material y métodos

Se han utilizado ratas Wistar, machos, de dos meses de edad y con un peso medio de 206 ± 8 g. Los animales fueron decapitados sin anestesia para evitar alteraciones, inducidas por el agente anestésico, en las aminos cerebrales (11, 18). La decapitación se realizó siempre a la misma hora para prevenir, en lo posible, los cambios producidos por el ritmo circadiano en los niveles de las aminos (17, 19).

El cerebro fue extraído rápidamente, pasado por solución salina isotónica muy fría y depositado en una placa de vidrio colocada sobre mezcla frigorífica, donde se realizó la disección de las diversas zonas. Las áreas estudiadas han sido: cerebelo, bulbo raquídeo, puente y corteza (que fue separada siguiendo el cuerpo calloso, quedando los hemisferios cerebrales decorticados. El diencefalo fue obtenido de la parte anterior intacta mediante cinco cortes, siguiendo la técnica de GLOWINSKI e IVERSEN (12). Las piezas de tejido se homogeneizaron en un «potter» introducido en baño de hielo, con 1,5 ml de HCl 0,01 N, muy frío, y 0,1 ml de EDTA 10 %; el homogeneizado se vertió en un tubo de centrifuga que contenía 20 ml de

butanol y 3 g de ClNa. El homogenizador se lavó con 1,5 ml de HCl 0,01 N y posteriormente con 5 ml de butanol, vertiéndolo también en el tubo. Los tubos se introdujeron en un baño de hielo, agitándolos durante diez minutos, y posteriormente se centrifugaron a 3.000 r.p.m. otros cinco minutos.

Extraído el sobrenadante, se puso en un tubo de centrifuga que contenía 40 ml de n-heptano y 2 ml de tampón fosfato 0,5 M, pH 7,3. Se agitó y seguidamente se centrifugó a 2.000 r.p.m. durante ocho minutos. El tampón fosfato fue extraído del fondo del tubo, acidificado hasta pH 3,5-4 con HCl 3 N, y se le añadieron 20 ml de éter etílico. Nuevamente se agitó y centrifugó a 2.000 r.p.m. durante ocho minutos.

De la capa acuosa se tomaron directamente fracciones que oscilaban entre 0,3 y 0,1 ml, en tubos cerrados con tapón hermético. A cada tubo se añadió 0,5 ml de tampón acetato 2 M, pH 6,8, completando el volumen a 3,8 ml con agua destilada. Con cinco minutos de intervalo entre uno y otro, se añadieron los siguientes reactivos: 0,1 ml de solución de iodo (3,75 g de iodo y 12,5 g de INa en 250 ml de agua destilada), 0,2 ml de sulfito sódico alcalino/EDTA (12,6 g de $\text{SO}_3\text{Na}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 25 ml de EDTA 10 % y se completaron hasta 250 ml con NaOH 5 N), y 0,25 ml de una mezcla isovolumétrica de ácido acético y HCl. Después de añadir cada reactivo, los tubos, agitados y tapados herméticamente, se pusieron en un baño de agua hirviendo durante 45 minutos. Se sacaron e introdujeron en hielo para su enfriamiento rápido hasta temperatura ambiente. Todas las muestras se hicieron por duplicado. Además, se pusieron: blancos, constituidos por 1 ml de agua destilada, y patrones de 1 ml de solución de clorhidrato de dopamina con concentraciones que oscilaban entre 0,2 y 0,5 $\mu\text{g/g}$. Con estos tubos se procedió como con los demás.

Se prepararon también blancos de teji-

Tabla I. *Concentración y cantidad total de dopamina en las distintas zonas del cerebro de rata.*

Todos los datos están expresados como media $\pm$ error estándar. Entre paréntesis, número de determinaciones por grupo.

Zona	Peso g	Concentración $\mu\text{g/g}$	Cantidad total μg
Cerebro entero (12)	$1,647 \pm 0,050$	$0,702 \pm 0,025$	$1,156 \pm 0,020$
Diencéfalo (12)	$0,241 \pm 0,010$	$1,047 \pm 0,025$	$0,252 \pm 0,005$
Cerebelo (6)	$0,262 \pm 0,014$	$0,283 \pm 0,004$	$0,074 \pm 0,004$
Corteza (6)	$0,658 \pm 0,012$	$0,511 \pm 0,004$	$0,336 \pm 0,004$
HCD *	$0,506 \pm 0,024$	$1,486 \pm 0,017$	$0,752 \pm 0,004$
Bulbo puente (6)	$0,251 \pm 0,012$	$0,560 \pm 0,005$	$0,151 \pm 0,004$

* Hemisferios cerebrales decorticados.

do (muestras en las que se había invertido el orden de adición de las soluciones de iodo y sulfito sódico alcalino), y patrones internos para estudiar la recuperación de la amina a lo largo del proceso de extracción. Se tomaron cerebros enteros, homogeneizando con 3 ml de HCl 0,01 N muy frío y 0,1 ml de EDTA 10 %. El homogeneizado se dividió en dos fracciones: a una de ellas se le añadió una cantidad conocida de clorhidrato de dopamina (del mismo orden que la cantidad total aproximada que contiene). Ambas fracciones fueron tratadas según procedimientos de rutina.

Aunque el fluorocromo es estable durante ocho horas, las lecturas se hicieron en todos los casos dentro de las cuatro horas siguientes al fin de la ebullición.

La valoración fue realizada en un espectrofluorómetro de Perkin Elmer equipado con cubetas de cuarzo de 3 ml de capacidad y 1 cm de espesor. Las constantes para la lectura, determinadas en experiencias previas, fueron las siguientes: longitud de onda de excitación: 335 nm; longitud de onda de emisión 380 nm. Las lecturas de las muestras correspondientes a las fluorescencias del blanco (muy próximas a cero) se restaron de las lecturas de las muestras tratadas.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado fluorométrico. Tanto ellos como el

agua destilada se guardaron en recipientes de vidrio con tapón del mismo material, para evitar interferencias del plástico o de la goma con la fluorescencia.

Resultados

En el intervalo de concentraciones utilizadas (0-0,5 $\mu\text{g/ml}$) la relación entre la lectura espectrofluorométrica y la concentración de la amina es perfectamente lineal. La tabla I muestra el peso medio de las áreas de cerebro utilizadas, la concentración de dopamina y la cantidad total que corresponde a cada área. La tabla II compara los valores obtenidos con muestras de cerebro entero, directamente, y los obtenidos sumando los correspondientes a las zonas en que el cerebro se ha dividido: cerebelo, bulbo raquídeo más

Tabla II. *Comparación de las cifras obtenidas por valoración directa y por suma de las zonas que componen el cerebro.*

Entre paréntesis, número de determinaciones por grupo.

	Peso g	Concen- tración $\mu\text{g/g}$	Cantidad total μg
V. directa (12)	1,647	0,702	1,156
V. por suma (6)	1,677	0,776	1,303
Diferencia	0,030	0,074	0,147
%	1,8	10,5	12,8

puente, hemisferios cerebrales decortados y corteza.

De las experiencias de patrón interno se ha deducido que la recuperación de la amina es $70,2 \pm 2,2$ %, partiendo de diez valoraciones por duplicado.

Discusión

Aunque el estudio y valoración cuantitativa de las catecolaminas data de principios de siglo (8, 16), recibió su gran impulso con la aparición de los métodos histoquímicos fluorescentes (6) y las técnicas autorradiográficas (22), que permitieron su localización en las diversas zonas del sistema nervioso. La clave de su valoración cuantitativa está en el desarrollo de las técnicas espectrofluorométricas en las que se basa el presente método. Los procedimientos de extracción y valoración utilizados se basan en los descritos por WELCH y WELCH (21), adoptados por las ventajas que presentan: *a*) el método es aplicable, con pequeñas variaciones, a la determinación de noradrenalina, dopamina, serotonina y ácido 5-hidroxiindol acético, en pequeñas piezas de tejido; *b*) reduce considerablemente tanto el coste del proceso como el tiempo que se invierte en él, ya que se eliminan algunos de los pasos más tediosos, como la precipitación de proteínas y lipoproteínas cerebrales y la separación por cromatografía en columna; *c*) no es necesaria la presencia de aditivos reductores que pueden producir interferencias en la lectura de la fluorescencia; *d*) el rendimiento obtenido puede ser bastante elevado si se normalizan todas las etapas del proceso.

Para transformar la dopamina en un derivado fluorescente se ha empleado el método de la condensación con etilen diamina (20). Este método tiene el inconveniente de que los fluorocromos formados por la dopamina y la adrenalina tienen características fluorescentes similares: para obviar estos inconvenientes se ha utilizado un método basado en el de

CARLSSON y WALDECK (7), quienes a su vez se basaron en los métodos de estimación de adrenalina y noradrenalina mediante el trihidroxiindol (9). En este método las catecolaminas se oxidan transformándose en sus derivados indólicos que, en medio alcalino, se reestructuran para dar trihidroxiindoles fluorescentes, adrenolutina y noradrenolutina.

En principio, esta técnica tampoco serviría para la valoración de dopamina, pues los picos de excitación y emisión de fluorescencia del derivado trihidroxiindólico de la dopamina eran indistinguibles de los de la noradrenolutina; sin embargo, CARLSSON y WALDECK (7), mediante ciertas modificaciones en la técnica, consiguieron aumentar la fluorescencia para el derivado de la dopamina y obtener espectros que se diferenciaban claramente de los de la adrenolutina y la noradrenolutina. Así, el proceso en el que se basa la síntesis de la molécula fluorescente implica tres etapas: *a*) oxidación de la muestra con iodo a pH 6,5; *b*) reestructuración intramolecular por adición de una solución alcalina de sulfito sódico, para prevenir una posterior oxidación (se puede utilizar con el mismo propósito el ácido ascórbico, pero se ha descartado por interferir con la fluorescencia); *c*) ajuste del pH a 5,3. Este paso permite el aumento de las longitudes de onda de activación y de emisión del fluorocromo derivado de la dopamina — para hacer posible la estimación diferencial de ésta —, y un mayor rendimiento del compuesto fluorescente. Para la acidificación ha sido utilizado bien el ácido acético (4, 7), bien el clorhídrico (2, 10); WELCH y WELCH propusieron la utilización de una mezcla isovolumétrica de acético y clorhídrico, consiguiendo una alta capacidad tampón y una pequeña variabilidad en el pH de las muestras con poca cantidad de ácido. Este último método es el que ha proporcionado mejores resultados; *d*) hervido de la muestra, para incrementar más aún su rendimiento. Un resultado parecido se puede

obtener por irradiación con ultravioleta (21), pero el hervido permite un mayor rendimiento y una mejor repetibilidad de los datos.

Los valores obtenidos por este método son, en general, coherentes con los descritos en la literatura. Así, la concentración obtenida para el cerebro entero (0,702 $\mu\text{g/g}$) es del orden de las publicadas en los últimos años, 1,06 $\mu\text{g/g}$ según ANSELL y BEESON (1) y 0,51 $\mu\text{g/g}$ según MARTIN y ANSELL (15) — por citar datos de un mismo laboratorio con distinta técnica —. Las concentraciones obtenidas para cerebelo, diencefalo, bulbo + puente, son muy similares a las descritas por KARIYA y APRISON (14); sin embargo, HAUBRICH y DENZER (13) dan cantidades menores para bulbo raquídeo + puente y cerebelo. La concentración de dopamina encontrada en la corteza es superior a la hallada por BLANC *et al.* (3), y por HAUBRICH y DENZER (13).

Además, el método utilizado parece ofrecer grandes garantías de repetibilidad, por presentar coeficientes de variación muy bajos (entre 4 y 10 %), lo que permite detectar las pequeñas diferencias que pudieran inducirse en la concentración de la amina al someter a los animales a cualquier influencia que interese estudiar.

El coeficiente de recuperación obtenido en estas experiencias es similar a los publicados recientemente (13, 21). Es posible una valoración muy ajustada de las cantidades de la amina en una pieza determinada, aun a concentraciones muy bajas.

Resumen

Se ha puesto a punto un método de extracción y valoración de dopamina en pequeñas áreas de cerebro de rata.

La extracción con disolventes permite eliminar el fraccionamiento por cromatografía en columna, pudiendo aplicarse simultáneamente a un número elevado de muestras. La recuperación obtenida, además de ser considerablemente elevada (70 %), es altamente reproducible.

Las valoraciones se han realizado en zonas con pesos a partir de 0,225 g. La determinación cuantitativa de la amina se ha realizado por métodos espectrofluorométricos, leyendo la fluorescencia del derivado trihidroxiindólico. La relación entre lectura y concentración es lineal entre 0 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

La concentración máxima se ha detectado en los hemisferios cerebrales decortcados (1,485 $\mu\text{g/g}$), siguiendo el diencefalo (1,046 $\mu\text{g/g}$). La concentración mínima correspondiente al cerebelo (0,283 $\mu\text{g/g}$). El cerebro entero tiene una concentración de 0,701 $\mu\text{g/g}$. El coeficiente de variación de las medidas oscila entre el 4 y el 10 %.

Bibliografía

1. ANSELL, G. B. y BEESON, M. F.: *Anal. Biochem.*, **23**, 96-206, 1968.
2. ANTON, A. H. y SAYRE, D. F.: *Pharmacol. Exp. Ther.*, **145**, 326-336, 1964.
3. BLANC, G., GLOWINSKI, J., STINUS, L. y THIERRY, A. M.: *Brit. J. Phar.*, **47**, 648, 1973.
4. BROWNLEE, G. y SMINGS, T. L.: *J. Phar. Pharmacol.*, **17**, 429-433, 1965.
5. CARLSSON, A.: *Pharm. Rev.*, **11**, 490-493, 1959.
6. CARLSSON, A., FALCK, B. y HILLARP, N. A.: *Acta Physiol. Scand.*, **56**, Supl. 196, 1-26, 1962.
7. CARLSSON, A. y WALDECK, B.: *Acta Physiol. Scand.*, **44**, 293-298, 1958.
8. ELLIOT, T. R.: *J. Physiol.*, Lond., **32**, 401-426, 1905.
9. EULER, V. S. VON y FLODING, I.: *Acta Physiol. Scand.*, **33**, Suppl. 118, 45-56, 1955.
10. FLEMING, R. M., CLARK, W. G., FENSTER, F. B. y TOWNE, J. I.: *Anal. Chem.*, **57**, 692-696, 1965.
11. FRIEDMAN, A. H. y WALKER, C. A.: *J. Physiol.*, Lond., **197**, 77-85, 1968.
12. GLOWINSKI, J. y IVERSEN, L. L.: *Neurochem.*, **13**, 655-669, 1966.
13. HAUBRICH, D. R. y DENZER, J. J.: *Anal. Biochem.*, **55**, 306-311, 1973.
14. KARIYA, T. y APRISON, M. H.: *Anal. Biochem.*, **31**, 102-113, 1969.
15. MARTIN, I. L. y ANSELL, G. B.: *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 521-523, 1973.
16. PEART, W. S.: *J. Physiol.*, Lond., **108**, 401-436, 1949.

17. SCHAMBERG, S. M., SCHIBKRAUT, J. J. y KOPIN, I.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **157**, 311-318, 1967.
18. SCHEVING, L. E., HARRISON, W. H., GORDON, P. y PAULY, J. E.: *Am. J. Physiol.*, **214**, 166-173, 1968.
19. VOGT, M.: *J. Physiol.*, Lond., **123**, 451-481, 1954.
20. WEIL MALHERBE, H. y BONE, A. D.: *Biochem. J.*, **67**, 65-72, 1957.
21. WELCH, A. S. y WELCH, B. L.: *Anal. Biochem.*, **30**, 161-179, 1969.
22. WOLFE, D. E., POTTER, L. T., RICHARDSON, K. C. y AXELROD, J.: *Science*, **138**, 440-441, 1962.