

## Estudios sobre la liberación de dopamina- $\beta$ -hidroxilasa por nicotina

M. T. Miras-Portugal, A. Galarza, J. Díaz y A. Santos-Ruiz

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Farmacia  
Madrid - 3

(Recibido el 6 de diciembre de 1976)

M. T. MIRAS-PORTUGAL, A. GALARZA, J. DIAZ and A. SANTOS RUIZ. *Studies on the Release of Dopamine- $\beta$ -hydroxylase by Nicotine*. Rev. esp. Fisiol., 34, 9-14. 1978.

Comparative studies were made on the release of DBH by adrenal medullary slices after colinomimetic stimulation with acetylcholine, DMPP or nicotine.

The *in vivo* effects of nicotine on the circulating plasma dopamine- $\beta$ -hydroxylase were tested in habitual and non habitual smokers after five cigarettes (12.5 mg of nicotine).

The rise of plasma enzyme activity may reflect the increased catecholamine release from adrenal and peripheral adrenergic nerves.

La dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (3,4-dihidroxi-feniletilamina, ascorbato:O<sub>2</sub> oxidoreductasa ( $\beta$ -hidroxilación) (E.C. 1.14.17.1) (DBH) cataliza la última etapa de síntesis de la noradrenalina por hidroxilación de la dopamina. Se encuentra localizada al nivel de los gránulos cromafines de las células de la médula suprarrenal (24) y de las terminaciones de las neuronas noradrenérgicas del sistema nervioso central (13) y periférico (11). Como consecuencia de una estimulación, la DBH es liberada al exterior de la célula conjuntamente con las catecolaminas y otros componentes solubles de los gránulos cromafines o de las vesículas sinápticas. Este fenómeno de exocitosis ha sido puesto de manifiesto al nivel de la médula suprarrenal (4) y del sistema nervioso simpático periférico (9).

En 1971, diversos autores (10, 25) ponían de manifiesto la actividad de la DBH en suero humano. Esta constatación y la liberación por exocitosis del enzima, les condujo a proponer la medida de esta actividad como parámetro de la actividad simpática. Posteriormente, ciertos experimentos parecían demostrar que la actividad de la DBH en suero era únicamente debida a la liberación de las terminaciones simpáticas (26), aunque experimentos más recientes en cobaya sugieren que la actividad de la DBH en suero es debida tanto a las terminaciones nerviosas simpáticas como a la médula adrenal (8).

La liberación *in vitro* de la DBH a partir de suprarrenales o de nervios simpáticos en perfusión, por la influencia de diversos agentes, ha sido estudiada con cierta extensión (7, 28). Por el contrario,

su liberación *in vivo* por la acción de diversos fármacos está muy poco estudiada (2).

En lo que concierne a la nicotina administrada de forma intravenosa o en inhalación, produce la liberación de catecolaminas de la médula suprarrenal y de las terminaciones nerviosas adrenérgicas (23), paralelamente se produce un aumento en la excreción de catecolaminas urinarias y de sus metabolitos (1, 6). Una respuesta similar es producida por el DMPP (dimetil-fenil-piperazina), agente colinomimético que actúa sobre los receptores nicotínicos (14). Como la liberación de las catecolaminas está íntimamente relacionada con la DBH, al liberarse conjuntamente por el mecanismo de exocitosis, parece que el estudio de la liberación del enzima podría proporcionar datos más exactos sobre la influencia de estos agentes colinomiméticos en la actividad simpática. Señalando a este respecto que así como las catecolaminas tienen una vida media en el plasma de 30 segundos (27), debido esencialmente a fenómenos de reabsorción neural y extraneural (12), la DBH no sufre estos fenómenos de reabsorción específica.

### Material y métodos

*Preparación de los cortes de médula suprarrenal.* Las glándulas suprarrenales fueron recogidas en el matadero antes de 15 min de haber sido sacrificado el animal, e introducidas en sacarosa 0,3 M a 4° C para su transporte al laboratorio. Se eliminó la corteza suprarrenal y con la parte medular se hicieron cortes de unos 50 mg de peso. Para cada serie de experimentos se utilizaron cortes de la misma glándula con el fin de eliminar los efectos debidos a las diferencias particulares de cada animal.

Los cortes se lavaron 4 veces con 100 ml de solución tampón, pH 7,4, conteniendo: ClNa, 8,06 g; ClK, 0,35 g; SO<sub>4</sub>Mg 7 H<sub>2</sub>O, 294 mg; PO<sub>4</sub>KH<sub>2</sub>, 162 mg; glucosa, 2,07 g.

y albúmina de suero bovina (Sigma), 2,5 g por litro.

*Estimulación de los cortes de médula suprarrenal.* Una vez lavadas y pesadas las muestras de médula fueron introducidas durante distintos tiempos en 1 ml de la solución tampón descrita, con calcio (10 mM) y una de las sustancias siguientes: acetilcolina  $2,1 \times 10^{-4}$  M (Sigma) nicotina  $1 \times 10^{-5}$  M (Merck) o DMPP  $3,1 \times 10^{-5}$  M (Aldrich), según el experimento. La incubación se realizó a 37° C, con agitación suave. La DBH liberada en el medio de incubación se valoró con 25  $\mu$ l de este medio. Los resultados se expresan por mg de tejido fresco incubado.

*Experimentación en sujetos humanos fumadores y no fumadores.* Veinte personas de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 21 y los 34 años de edad (media 26), se distribuyeron en dos grupos: fumadores habituales y no fumadores; en cada grupo se consideró cinco miembros como testigo y a los otros cinco se les hizo fumar, en media hora, cinco cigarrillos por persona, conteniendo un total de 12,5 mg de nicotina (2,5 mg de nicotina por unidad). Las tomas de sangre (1 ml) se realizaron antes de empezar a fumar (tiempo 0), a los 30 min, es decir, una vez finalizada la sesión de fumar, y a los 60 y 90 min. A los testigos, alejados del humo, se les extrajo igualmente las muestras de sangre.

*Valoración de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa.* Para valorar la DBH se emplea como sustrato la tiramina (p-oxifeniletiamina), por sufrir la dopamina, sustrato fisiológico del enzima, una rápida oxidación haciendo imposible su uso.

*Valoración de la DBH presente en el medio de incubación de cortes de médula suprarrenal.* La técnica empleada es una modificación (17) del método de PISANO *et al.* (20).

*Valoración de la DBH de plasma humano.* La sangre es recogida sobre heparina en polvo, se centrifuga a 3.000 rpm y en el plasma obtenido se determina la actividad por una modificación (2) del método de NAGATSU *et al.* (19). La actividad se determina en presencia o ausencia de cobre, con objeto de conocer la actividad óptima y la actividad inicial, respectivamente. El cobre elimina la acción de posibles inhibidores presentes en plasma (compuestos con grupos SH y agentes quelantes) y activa el enzima que haya perdido su cobre catalítico.

## Resultados

*Liberación de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa de los cortes de médula suprarrenal.* La nicotina, la DMPP y la acetilcolina liberan DBH de los cortes de médula suprarrenal. Las concentraciones de estas sustancias que dieron un máximo de liberación son: acetilcolina  $2,1 \times 10^{-4}$  M; DMPP  $3,1 \times 10^{-5}$  M y nicotina  $1 \times 10^{-5}$  M; estas molaridades son consideradas en el medio de incubación. La acetilcolina produce el máximo de liberación, la DMPP y la nicotina presentan una efectividad con respecto a la cetilcolina de 58 % y de 50 %, respectivamente (tabla I, fig. 1). La liberación del enzima por estas sustancias sigue una cinética bifásica. Para obtener los valores de la figura 1 se ha realizado a diferentes tiempos el experimento reseñado en la tabla I, restando de los valores obtenidos los valores de la liberación espontánea del control; este

control no contiene ningún agente calinomimético, pero sí contiene calcio 10 mM.

*Liberación de DBH in vivo en sujetos fumadores y no fumadores.* La inhalación de nicotina produce un aumento en contenido de DBH en el plasma (tabla II). Este aumento es más importante en las actividades iniciales, pues al ser la actividad enzimática mucho menor, el aumento en porcentaje es más elevado y se puede asociar con más precisión al enzima recientemente liberado. La actividad óptima es por término medio cuatro veces más elevada que la inicial.

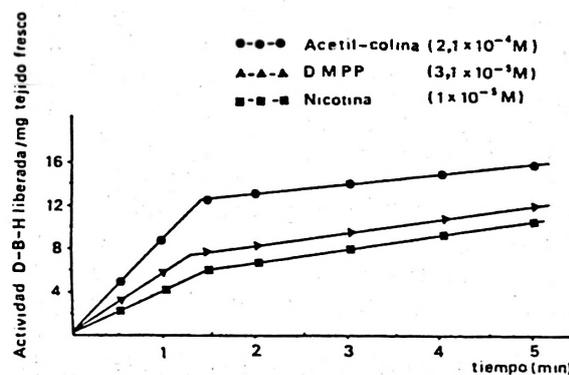


Fig. 1. Liberación de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa in vitro, en cortes de tejido de médula suprarrenal bovina.

Los cortes de 50 mg de peso aproximadamente, son mantenidos distintos tiempos en el medio de incubación, en presencia de calcio 10 mM. La actividad de la DBH está expresada en nmol de octopamina formada durante 30 min/mg de tejido fresco.

Cada punto corresponde a la media de cinco determinaciones.

Tabla I. Actividad de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa liberada de cortes de tejido suprarrenal. Actividad expresada en nmol de octopamina formada en 30 min por la DBH liberada de cortes de tejido suprarrenal y expresada por mg de tejido fresco. Los cortes fueron estimulados durante 1 min. Los valores expresados son la media de cinco experimentos.

Actividad DBH	Control	Acetilcolina ( $2,1 \times 10^{-4}$ M)	Nicotina ( $1 \times 10^{-5}$ M)	DMPP ( $3,1 \times 10^{-5}$ M)
Liberada (total)	$0,8 \pm 0,2$	$9,4 \pm 0,8$	$5,1 \pm 0,6$	$5,8 \pm 0,4$
Liberada (real)		$8,6 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,4$	$5 \pm 0,2$
%		100	50	58

Tabla II. *Acción de la nicotina sobre la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa circulante.*  
La actividad está expresada en % promedio de la actividad a tiempo 0. N.S. es no significativo.  
El grupo de fumadores y no fumadores consta cada uno de cinco sujetos; cada valor es la media de cinco determinaciones.

Tiempo (min)	% Actividad DBH inicial		p	% Actividad DBH óptima		p
	Fumadores	No fumadores		Fumadores	No fumadores	
0	100	100		100	100	
30	107 $\pm$ 1,3	114 $\pm$ 1,2	0,01	103 $\pm$ 2,3	104 $\pm$ 2,8	N.S.
60	108 $\pm$ 0,9	113 $\pm$ 1,1	0,02	103 $\pm$ 2	105 $\pm$ 2,6	N.S.
90	109 $\pm$ 1,2	110 $\pm$ 1,1	N.S.	103 $\pm$ 1,8	104 $\pm$ 2,2	N.S.
120	108 $\pm$ 1,5	108 $\pm$ 1,3	N.S.	103 $\pm$ 2,4	103 $\pm$ 2	N.S.

El incremento de la actividad de la DBH en plasma es más acusado en el caso de los no fumadores y presenta el máximo 30 min después de haber empezado a fumar. El máximo en los fumadores habituales se obtiene entre los 60 y los 90 min.

En la tabla II se resumen los incrementos de actividad, promedio de los cinco sujetos experimentados, expresados respecto a la propia actividad a tiempo 0, por ser la actividad plasmática un factor extraordinariamente variable de un individuo a otro. Estas diferencias en la DBH plasmática son significativas a tiempo 30 min, débilmente significativas a los 60 min, y no significativas en tiempos posteriores. Es posible que estos resultados pudieran resultar significativos aumentando el número de sujetos de experimentación.

### Discusión

Las experiencias realizadas *in vitro* muestran que la DBH se libera por la acción de la acetilcolina o de los agentes que estimulan los receptores nicotínicos, como el DMPP o la nicotina. La liberación del enzima sigue una cinética bifásica en función del tiempo. En este aspecto conviene señalar que la liberación de la noradrenalina por los tejidos que la contienen es máxima en los primeros 60 segundos y, después, crece rápidamente (15,

16), debido a un empobrecimiento del tejido, aunque algunas experiencias más actuales indican que la noradrenalina liberada actuaría sobre los receptores alfa-presinápticos, que existen igualmente en el tejido de la médula suprarrenal, inhibiendo la exocitosis de catecolaminas (5, 22), disminuyendo así no sólo la liberación de la DBH, sino también de la DBH soluble.

*In vitro*, el DMPP es mejor estimulador de la médula suprarrenal que la nicotina, pues además de estimular los receptores nicotínicos, parece tener una acción similar a la de la tiramina (18). Estos experimentos permiten dar una mejor explicación a las experiencias *in vivo* con seres humanos, cuyo estudio depende de más parámetros, algunos de ellos desconocidos.

La nicotina inhalada al fumar produce una liberación de la DBH, más acusada y más rápida en los no fumadores; los fumadores están en abstinencia de tabaco desde 12 horas antes, pues de otro modo no se produce variación alguna. El aumento de actividad de la DBH en suero en el caso de los fumadores es más débil y además emplea más tiempo en alcanzar el máximo.

Como esta proteína tiene una vida media en plasma mucho más elevada que las catecolaminas, su actividad disminuye lentamente hasta alcanzar el valor normal; que, según anteriores experiencias, podría resultar hasta de 1 día en el hom-

bre (3) y de 2 a 3 horas en el cordero (21).

El mayor incremento de la actividad en el caso de sujetos no fumadores se podría explicar por una habituación, que comportaría tanto un aumento en los enzimas que transforman la nicotina en el hígado (23), como una respuesta menos intensa por parte de los receptores.

El hecho de que el mismo enzima de síntesis de la noradrenalina y de la adrenalina sea liberado de los gránulos cromafines o de las vesículas sinápticas por la nicotina, podría suponer la existencia de anomalías en la síntesis de catecolaminas, aunque no aparecen referencias a esta posibilidad, lo que concuerda con resultados recientes (17), según los cuales, la DBH ligada a la membrana, no liberada por exocitosis, es el enzima fisiológicamente activo.

### Resumen

La liberación de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa de cortes de médula suprarrenal ha sido estudiada de forma comparativa después de estimular con agentes colinomiméticos, como la acetilcolina, el DMPP o la nicotina.

Los efectos *in vivo* de la nicotina sobre la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa circulante en el plasma se analizaron sobre 10 sujetos fumadores habituales y 10 no fumadores, después de fumar 5 cigarrillos (12,5 mg de nicotina en total). El aumento de la actividad enzimática en plasma puede reflejar el aumento de catecolaminas liberadas de la médula suprarrenal, así como de las terminaciones nevirosas adrenérgicas.

### Bibliografía

- AGUÉ, C.: *Biol. Psychol.*, **1**, 229-236, 1974.
- AUNIS, D., MANDEL, P. y MIRAS-PORTUGAL, M. T.: *Br. J. Pharmacol.*, **53**, 425-427, 1975.
- AUNIS, D., MIRAS-PORTUGAL, M. T., COQUILLAT, G., WARTER, J. M. y MANDEL, P.: *Clin. Chim. Acta*, **70**, 455-458, 1976.
- BANKS, P., y HELLE, K. B.: *Biochem. J.*, **97**, 40-41, 1965.
- CUBEDDU, X., BARNES, E. M., LANGER, S. Z. y WEINER, N.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **190**, 431-450, 1974.
- FRANKENHAUESER, M., MYRSTEN, A. L. y POST, B.: *Scand. J. Psychology*, **110**, 237-245, 1970.
- FRYDMAN, R. y GEFFEN, L. B.: *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 166-174, 1973.
- GARCÍA, A. G. y HORGA, J. F.: *Congreso FESBE*, Madrid, 1976. Abs. 77.
- GEFFEN, L., LIVETT, B. G. y RUSH, R. A.: *J. Physiol.*, **204**, 58-59, 1969.
- GOLDSTEIN, M., FREEMAN, L. S. y BONNAY, M.: *Experientia*, **27**, 632-633, 1971.
- HARTMAN, K. B. y UDENFRIEND, S.: *Pharmacol. Rev.*, **24**, 311-330, 1972.
- IVERSEN, L. L.: *Br. Med. Bull.*, **29**, 130-135, 1973.
- KLEIN, R. L. y THURESON-KLEIN, A. K.: *Fed. Proc.*, **33**, 2195-2206, 1974.
- LINDMAR, R.: *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol. Exp. Path.*, **242**, 458-466, 1962.
- LINDMAR, R., LÖFFELHOLTZ, K. y MUSCHOLL, E.: *Experientia*, **23**, 933-934, 1967.
- LÖFFELHOLTZ, K.: *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol. Exp. Path.*, **258**, 108-122, 1967.
- MIRAS-PORTUGAL, M. T., JORDÁ, A. y SANTOS-RUIZ, A.: *FEBS Letters*, **72**, 267-270, 1976.
- MUSCHOLL, E.: En «New Aspects of Storage and Release Mechanisms of Catecholamines», Bayer-Symposium II (H. J. SCHÜMANN, G. KRONEBERG, ed.), Springer-Verlag, 1970, 168-186.
- NAGATSU, T. y UDENFRIEND, S.: *Clin. Chem.*, **18**, 980-983, 1972.
- PISANO, J. J., CREVELING, C. P. y UDENFRIEND, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **43**, 566-568, 1960.
- RUSH, R. A. y GEFFEN, L. B.: *Circ. Res.*, **31**, 444-452, 1972.
- STJÄRNE, L.: *Nature*, **241**, 190-191, 1973.
- TSUJIMOTO, A., NISHIKAWA, T., DOHI, T. y KOJIMA, S.: *Europ. J. Pharmacol.*, **26**, 236-242, 1974.
- VIVEROS, O. H., ARQUEROS, L. y KIRSHNER, N.: *Life Sci.*, **7**, 609-618, 1968.
- WEINSHILBOUM, R. M. y AXELROD, J.: *Circ. Res.*, **28**, 307-315, 1971.
- WEINSHILBOUM, R. M. y AXELROD, J.: *Science*, **173**, 931-934, 1971.
- WHITBY, L. B., AXELROD, J. y WEIL-MALHERBE, H.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **132**, 193-201, 1961.
- WOOTEN, G. F., THOA, N. B., KOPIN, I. J. y AXELROD, J.: *Molec. Pharmacol.*, **9**, 178-183, 1973.

