

DISTRIBUCIÓN *IN VIVO* Y CAPTACIÓN CEREBRAL DE SEROTONINA POR IMÁGENES PLANAS EN CONEJOS

Martín G. Vitale^a, Carlos O. Cañellas^b, Arturo A. Vitale^c y Alicia B. Pomilio^c

^a Unidad Académica 2, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

^b Tecnonuclear S.A., Buenos Aires, Argentina.

^c Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL, CONICET y UBA), Facultad de Farmacia y Bioquímica/Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina avitale@ffyb.uba.ar; pomilio@ffyb.uba.ar

Introducción

La serotonina (5-hidroxitriptamina) es una de las moléculas más antiguas filogenéticamente, que se encuentra en el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados e invertebrados y juega un rol de neurotransmisor/neuromodulador. También funciona como señal de desarrollo en el SNC y modula varias funciones fisiológicas en la periferia, como: motilidad intestinal, agregación plaquetaria y vasoconstricción.

Dentro del SNC la serotonina participa en distintas funciones como cognición, estado de ánimo, inhibición frontal y funciones motoras, mediante: 1) acción sobre los distintos receptores 5HT. 2) modulación de la liberación de otros neurotransmisores, como glutamato, GABA, acetilcolina y dopamina.¹

En el hombre, ca. 90% de la serotonina corporal está confinada en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal, otro 8-10% se transporta en las plaquetas y sólo 1-2% se encuentra en el SNC. Hay controversias respecto a su pasaje a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Aunque en muchos trabajos se insiste en que no la atraviesa, existen evidencias de lo contrario.²⁻⁶

Clásicamente se consideró a la BHE como una unidad esencialmente histológica, en el cual la permeabilidad selectiva estaba determinada principalmente por las uniones estrechas del endotelio periférico, que solo permiten el pasaje de moléculas liposolubles y de un tamaño menor a los 400 daltons, con lo cual cumple parcialmente la serotonina. Hoy en día se ha incorporado el concepto de unidad neurovascular (UNV)⁷, en la cual la interacción entre astrocitos, endotelio y células del sistema inmune regula en forma dinámica la permeabilidad selectiva de la BHE así como el patrón de expresión génica de distintos transportadores endoteliales, con lo cual ya no es posible basarnos en el criterio histológico/morfológico de la BHE para predecir cuan permeable será a distintos compuestos.

Decidimos por ello encarar esta investigación, con el objetivo de verificar si la serotonina atraviesa la BHE y en tal caso, estudiar su distribución *in vivo*. Para ello, la serotonina fue marcada con I-131 y con Tc-99m, inyectada en conejos y la captación medida por cámara-*gamma* (imágenes planas).

Materiales y métodos

Se sintetizó [¹³¹I]2-iodoserotonina y la identificación se realizó mediante ¹H- y ¹³C-RMN y espectros de masa directos de impacto electrónico (EI-MS); la serotonina también se marcó con Tc-99m. La serotonina marcada se inyectó en conejos por la vena marginal de la oreja. Se realizaron estudios de biodistribución dinámica en cámara-*gamma*. Se evaluaron la captación cerebral, el clearance plasmático y la excreción renal. Los resultados se compararon con otras indolalquilaminas que estudiáramos previamente.⁸

La biodistribución se evaluó en conejos europeos endogámicos, siendo las imágenes adquiridas cada 30 segundos hasta 60 minutos, y cada 10 minutos hasta las 6 h de Tc-99m; regiones de interés (ROIs): cerebro, hígado, corazón, riñones y vejiga. Se obtuvieron gráficos de clearance y decaimiento para los órganos diana. Los datos se procesaron a los 120, 180, 240 y 360 minutos después de la administración. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo bajo condiciones experimentales aprobadas por CICUAL ("Comité Institucional sobre el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio", Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires), y de conformidad con los principios internacionalmente aceptados en el cuidado y uso de animales de experimentación. El clearance plasmático se llevó a cabo para [131-I] y [99m-Tc]serotonina en conejos, y se recogieron muestras de sangre a diferentes tiempos en viales de peso conocido. Se midieron en un contador-*gamma* y los resultados se expresaron como cuentas por minuto (cpm)/g de sangre, que después de la corrección de decaimiento representó actividad específica (SA). Los datos se representaron como $\ln SA$ vs tiempo. También se estudió la excreción renal de serotonina marcada. Después de la inyección en conejos, se recogieron muestras de orina (jaula metabólica) a los 10, 20 y 60 min después de la inyección. Se midió la radioactividad en un contador *gamma* calibrado. Alícuotas de orina fueron cromatografiadas en ITLC en cloroformo:ácido acético (9:1) (visualización en atmósfera de yodo), y además se analizaron en busca de metabolitos por cromatografía de gases-espectrometría de masa (CG-EM). Todos los resultados se sometieron a análisis estadístico.

Resultados

La pureza de 2-iodoserotonina se comprobó mediante CG, siendo superior al 99%. [131-I]serotonina se obtuvo con una eficiencia de marcación cercana al 90%. La pureza radioquímica fue también muy alta, del 98,0%. La [131-I]serotonina mostró el mismo comportamiento que marcada con Tc-99m en relación con la biodistribución en los ROIs, captación cerebral, tiempo de residencia y excreción.

La serotonina marcada cruzó la BHE, entró en el cerebro del conejo y fue completamente excretada en orina 20 minutos después de la inyección. La captación en el cerebro se expresó como porcentaje de dosis inyectada de serotonina marcada. El metabolito principal excretado en orina fue identificado por CG-EM como ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y en menor proporción, 5-hidroxitriptofol (5-HTOL).

La actividad de serotonina en el cerebro se comparó con otras indolalquilaminas estudiadas en nuestros laboratorios. La triptamina como neuromodulador del neurotransmisor serotonina se comportó de una manera similar, excretándose completamente 20 min después de la inyección, mientras que dimetilriptamina (DMT) se mantuvo en el cerebro del conejo, incluso después de la excreción de orina había cesado, siendo aún detectable después de siete días como se informó anteriormente.⁷

Conclusión

Nuestros resultados demostraron que la serotonina intravenosa cruza la BHE, detectándose en el cerebro ca. 0,06% de la dosis inyectada.

El catabolismo se produce a través de la desaminación oxidativa por las enzimas monoamino-oxidasas (MAO) en el hígado y diversos tejidos, siendo el más importante el pulmón. Hemos demostrado que 5-HIAA es el metabolito principal y se excreta por orina, junto con pequeñas cantidades de 5-HTOL. Después de la administración intravenosa de serotonina, probablemente se capta el 30-90% y se degrada por las células endoteliales pulmonares. El mecanismo de captación del pulmón es similar al de las plaquetas.

Según nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero en demostrar fehacientemente que la serotonina cruza la BHE y entra en el cerebro en conejos *in vivo*, siendo captada una determinada cantidad y detectada por un método de

medición muy sensible, fiable y no invasivo.

Referencias

1. Celada P., Puig M.V., Artigas F. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Front. Integr. Neurosci.* 2013; 7: 1-20.
2. Winkler T., Sharma H.S., Stålberg E., Olsson Y., Dey P.K. Impairment of blood-brain barrier function by serotonin induces desynchronization of spontaneous cerebral cortical activity: experimental observations in the anaesthetized rat. *Neuroscience* 1995; 68: 1097-1104.
3. Henderson L.A., Yu P.L., Frysinger R.C., Galons J.-P., Bandler R., Harper R.M. Neural responses to intravenous serotonin revealed by functional magnetic resonance imaging. *J. Appl. Physiol.* 2002; 92: 331-342.
4. Nakatani Y., Sato-Suzuki I., Tsujino N., Nakasato A., Seki Y., Fumoto M., Arita H. Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain barrier through the 5-HT transporter in rat. *Eur. J. Neurosci.* 2008; 27: 2466-2472.
5. Afergan E., Epstein H., Dahan R., Koroukhov N., Rohekar K., Danenber H.D., Golomb G. Delivery of serotonin to the brain by monocytes following phagocytosis of liposomes. *J. Controlled Release* 2008; 132: 84-90.
6. Polo P.A., Reis R.O., Cedraz-Mercez P.L., Cavalcante-Lima H.R., Olivares E.L., Medeiros M.A., Côrtes W.S., Reis L.C. Behavioral and neuropharmacological evidence that serotonin crosses the blood-brain barrier in *Coturnix japonica* (Galliformes; Aves). *Braz. J. Biol.* 2007; 67: 167-171.
7. Neuwelt E.A., Bauer B., Fahlke C., Fricker G., Iadecola C., Janigro D., Leybaert L., Molnár Z., O'Donnell M.E., Povlishock J.T., Saunders N.R., Sharp F., Stanimirovic D., Watts R.J., Drewes L.R. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011; 12: 169-182
8. Vitale A.A., Pomilio A.B., Cañellas C.O., Vitale M.G., Putz E.M., Ciprian-Ollivier J. *In vivo* long-term kinetics of *N,N*-dimethyltryptamine and tryptamine in brain by radioiodination planar imaging. *J. Nuclear Med.* 2011; 52: 970-977.