

23
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

DETERMINACION DE SEROTONINA EN EL SISTEMA NERVIOSO DEL ACOCIL PROCAMBARUS CLARKII MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION CON DETECCION FLUORESCENCIA

FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
MA. DEL SOCORRO ISLAS MENDOZA



DIRECTOR DE TESIS:
DR HUGO ARECHIGA URTUZUASTEGUI
COASESOR DE TESIS:
Q.F.B. VIRGINIA ANGELICA ROBINSON FUENTES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

| | Pag. |
|---|-----------|
| I INTRODUCCION | 1 |
| II GENERALIDADES | 3 |
| 2.1 Propiedades químicas. | 3 |
| 2.1.1 Solubilidad. | 4 |
| 2.1.2 Estabilidad. | 4 |
| 2.1.3 Identificación. | 5 |
| 2.2 Biosíntesis. | 6 |
| 2.3 Metabolismo. | 8 |
| 2.3.1 Acetilación. | 8 |
| 2.3.2 Conjugación. | 10 |
| 2.4 Funciones. | 12 |
| 2.5 Localización de la serotonina en crustáceos. | 13 |
| 2.5.1 La serotonina en el tallo ocular. | 17 |
| 2.6 Métodos de detección y determinación. | 21 |
| III OBJETIVOS | 27 |
| IV DESARROLLO EXPERIMENTAL | 28 |
| 4.1 Condiciones de trabajo. | 28 |
| 4.1.1 Espectro de fluorescencia de la serotonina. | 28 |
| 4.1.2 Fases móviles encontradas. | 29 |
| 4.1.3 Especificidad del método. | 30 |
| 4.2 Validación. | 30 |
| 4.2.1 Precisión y exactitud. | 30 |
| 4.2.2 Reproducibilidad. | 31 |
| 4.2.3 Linealidad del sistema. | 31 |
| 4.2.4 Linealidad del método. | 31 |
| 4.3 Tratamiento de las muestras biológicas. | 32 |
| 4.3.1 Disección del tejido. | 32 |
| 4.3.2 Método de extracción. | 33 |
| 4.3.3 Porcentaje de recuperación en la extracción. | 34 |
| 4.4 Análisis cromatográfico. | 35 |
| 4.5 Cuantificación de la serotonina en el tallo ocular. | 36 |
| 4.6 Identificación de la serotonina. | 36 |
| 4.6.1 Modificación de las variables cromatográficas. | 36 |
| 4.6.2 Cuantificación de la serotonina en el tallo ocular. | 37 |
| 4.7 Experimentos fisiológicos. | 37 |
| 4.7.1 Determinación del ciclo circádico. | 37 |
| 4.7.2 Distribución de la serotonina en el tallo ocular. | 38 |

| | | |
|------|---|----|
| V | RESULTADOS | 39 |
| | 5.1 Condiciones de trabajo. | 39 |
| | 5.2 Validación. | 39 |
| | 5.3 Cuantificación de la serotonina en el tallo ocular. | 54 |
| | 5.4 Identificación de la serotonina. | 58 |
| | 5.5 Ciclo circádico de la serotonina. | 60 |
| | 5.6 Distribución de la serotonina en el tallo ocular. | 60 |
| VI | DISCUSION | 67 |
| VII | CONCLUSIONES | 74 |
| VIII | BIBLIOGRAFIA | 77 |
| IX | ANEXOS | 83 |
| | 1.0 Equipo, material y reactivos. | 83 |
| | 2.0 Fórmulas empleadas. | 84 |
| | 3.0 Diseño experimental completamente al azar. | 87 |
| | 4.0 Abreviaturas usadas. | 88 |

I INTRODUCCION

La serotonina es un neurotransmisor que puede funcionar también como neurohormona en diferentes especies animales, tanto en vertebrados como en invertebrados. Fue aislada por primera vez de suero (54) y posteriormente se obtuvo de las células cromafines de la mucosa intestinal (21). El hecho que desencadena un gran número de investigaciones sobre ella es el haberla encontrado en el sistema nervioso central (3, 56) y la observación de que un potente agente alucinógeno (diethylamida del ácido lisérgico, LSD) es antagonista o antimetabolito de la serotonina, sin embargo, actualmente la relación causal entre las alucinaciones por LSD y la serotonina es muy dudosa, pero los usos terapéuticos de agonistas y antagonistas de la serotonina son ya muchos.

Se sabe que la serotonina actúa a diferentes niveles: en el corazón, acelera la frecuencia y amplitud del latido; en el glomérulo renal, actúa como una importante hormona en la regulación de la excreción urinaria; en el tracto gastrointestinal, estimula el peristaltismo y en el sistema nervioso central, actúa como una neurohormona (30).

Dada la multiplicidad de los procesos fisiológicos en los cuales interviene la serotonina, la complejidad del sistema nervioso de vertebrados y debido al escaso conocimiento que se tiene de este agente en el sistema nervioso central, se decidió utilizar al sistema nervioso de invertebrados específicamente a los crustáceos decápodos como modelo animal para cuantificar la

Finalmente se prueba la aplicabilidad del método en estudios fisiológicos tales como la determinación cuantitativa del contenido de la serotonina en las diferentes regiones anatómicas del tallo ocular, así como las variaciones en la concentración de serotonina en el transcurso del ciclo nictemeral.

A fin de fundamentar algunos de los métodos que se emplearon en el presente estudio, convendrá hacer una breve relación de las propiedades químicas de la 5- hidroxitriptamina.

II GENERALIDADES

2.1 PROPIEDADES QUÍMICAS.

La serotonina esta clasificada dentro del grupo de las indolalquilaminas, compuestos que constan de un anillo indólico y una cadena lateral (alquilamina), en unión covalente con el carbono 3 del anillo. El grupo alquilamina es una amina en la que uno o varios átomos de hidrógeno han sido reemplazados por grupos alquilo. El principal representante de este grupo es la serotonina. (fig. 1).

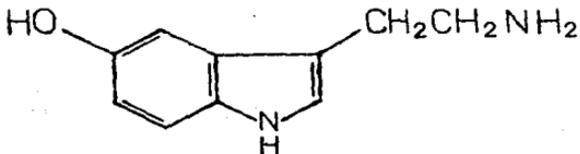


fig. 1 Estructura química de la serotonina.

La serotonina (C₁₀ H₁₂ N₂ O), tiene un peso molecular de 176.2 y es usualmente preparada como sal de sulfato de creatinina (C₁₄ H₂₃ N₅ O₇ S), aunque también se preparan sales de otros ácidos, los más conocidos son los picratos, los hidroclouros y los salicilatos. Cada sal tiene un punto de fusión característico. El punto de fusión de hidroclouros es de 167 - 168°C, los picratos de 185 - 194°C y el sulfato de creatinina de 212 - 216°C.

2.1.1 Solubilidad.

La solubilidad de la serotonina en agua es relativamente alta, y aumenta al elevar la temperatura (100 mg en 1 ml de agua hirviendo, en tanto que a 27°C, 20 mg se disuelven en 1 ml), es muy soluble en ácido acético glacial, ligeramente soluble en metanol y un 95% en etanol, es insoluble en acetona, piridina, cloroformo, éter etílico, acetato de etilo o benceno. Puesto que es escasamente soluble en lípidos tiene un coeficiente de partición aceite/agua de 0.00035. Las constantes de disociación son: pK₁ = 4.9 (creatinina), pK₂ = 10.0 (grupo amino terminal) y pK₃ = 11.1 (grupo hidroxilo del anillo).

2.1.2 Estabilidad

La estabilidad de la serotonina varía según las condiciones en las que se encuentre. A pH bajo la serotonina es muy estable. Por ejemplo Erspamer (20), describe la pérdida de solamente el 45 % después de hervir el extracto con HCl 0.1 N por una hora. Bajo nitrógeno a pH = 1.5 resiste una temperatura de 97°C por 6 horas

sin pérdida de actividad, en tanto que a pH = 0.5 hirviendo por 4 horas pierde un 40 % de actividad. En HCl 0.1 N las soluciones (0.5 ug/ml) son estables por varias semanas a una temperatura de 50C. Su máxima estabilidad se registra entre pH 5 - 6, en estas condiciones resiste hirviendo por varias horas en presencia de oxígeno atmosférico. A pH neutro (6.8-7.8) su estabilidad disminuye, es decir, es estable por 6 horas a temperatura ambiente y por 5 min a temperatura de ebullición.

Por otra parte a pH alcalino la serotonina es estable a temperatura de ebullición por solamente unos minutos (2 min a pH = 9.6 y 1 min a pH = 11). Es fácilmente oxidada en presencia de aire, desarrollando un color café violeta, particularmente a pH alcalino.

2.1.3 Identificación.

El espectro de absorción de la serotonina ha sido ampliamente estudiado, en solución ajustada a un pH = 3.5 hay un máximo de absorción a 275 nm con un pico subsidiario a 295 nm y un mínimo a 250 nm. El cambio a pH alcalino (pH = 11.6) causa una desviación en el pico subsidiario de 295 a 322 nm. El 5-hidroxitriptofano tiene un espectro de absorción muy similar, caracterizado por un máximo a 298 nm, un mínimo a 278 nm y un pico subsidiario a 291 nm, el cual se transfiere a 324 nm a pH = 11 (14).

El espectro de fluorescencia emitido por la serotonina se ha analizado por técnicas fluorométricas (5). Por este medio se sabe que los indoles activados a 275 nm fluorescen a 360 nm, los 5-hidroxiindoles activados a 295 nm fluorescen a 330 nm y la serotonina (5-hidroxitriptamina) activada a 280 nm presenta un máximo de fluorescencia entre 335 y 340 nm. En el intervalo de pH de 2 a 11, este fenómeno no se ve afectado. Sin embargo a un pH menor a 2 (obtenido con HCl 3N), los 5-hidroxiindoles activados a 295 nm fluorescen a 550 nm, longitud de onda que difiere de la encontrada en indoles no sustituidos en la posición 5.

2.2 BIOSINTESIS

La ruta biosintética de la serotonina en los invertebrados es similar a la encontrada en el sistema nervioso de vertebrados. La serotonina se sintetiza a partir del triptofano en dos pasos: 1.- hidroxilación a 5-hidroxitriptofano por la acción de la enzima triptofano hidroxilasa; 2.- Descarboxilación a serotonina por acción de la enzima Dopa/5-HTP descarboxilasa, enzima que ha sido identificada en insectos por Livingstone (45) (ver la fig. 2).

Lo anterior se ha determinado mediante la incubación de tejido con triptofano marcado radioactivamente, el cual es rastreado a diferentes intervalos de tiempo (50). Los resultados obtenidos muestran que la radioactividad está asociada únicamente con el triptofano, el 5-hidroxitriptofano y la serotonina. Por el contrario la ausencia de radioactividad en otros metabolitos de la serotonina como la triptamina, el 5-hidroxitriptofol, la N-

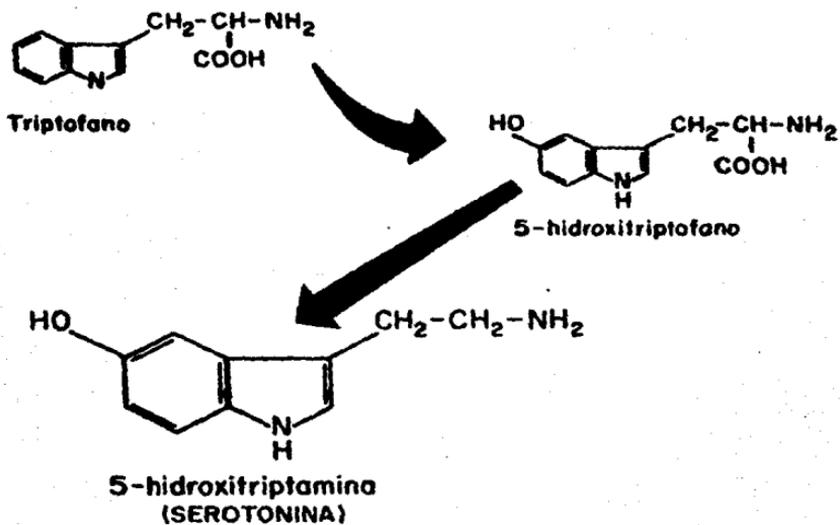


Fig. 2 Biosíntesis de la serotonina en invertebrados.

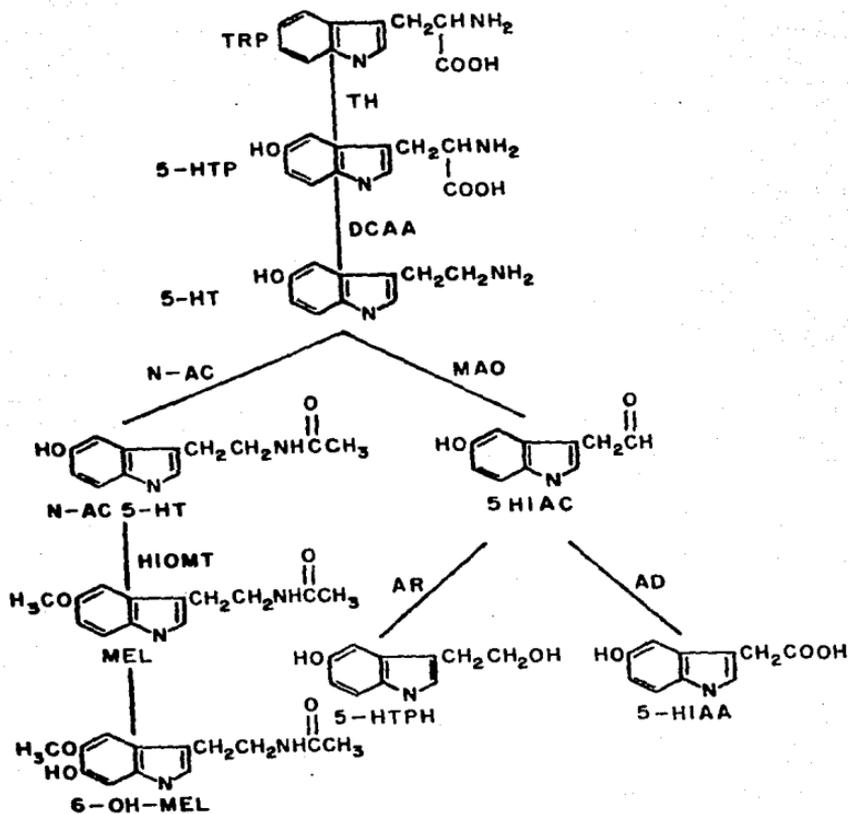


Fig. 3 Ruta metabólica de la serotonina en vertebrados.

En el tejido nervioso de *Drosophila*, se ha encontrado significativa actividad de N-acetiltransferasa hacia dopamina y serotonina (12). En muestras de cerebro de la abeja (*Apis mellifera*), se encuentran enzimas capaces de acetilar la triptamina y la serotonina (23). En la langosta (*Locusta migratoria*), la actividad de N-acetiltransferasa hacia octopamina, dopamina y serotonina es alta en el sistema nervioso y relativamente alta en otros tejidos de langosta excepto en el músculo exoesquelético donde es relativamente baja (34).

2.3.2 Conjugación.

Recientemente se ha mostrado que la conjugación con sulfato y alanina, es un importante paso en el metabolismo de las aminas biogénicas tanto en artrópodos como en mamíferos. La serotonina, octopamina, tiramina y dopamina contienen hidroxilos aromáticos, los cuales son los probables puntos de unión con el sulfato.

Asimismo se ha aislado y parcialmente purificado una enzima del tejido de langosta que cataliza la transferencia de un grupo sulfato del intermediario activo (PAPS) (3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfato) al anillo hidroxilo de las aminas. Lo anterior se ha determinado en tejido de langosta durante su incubación con 35 S04 y 3H-aminas (37).

Por otra parte en el sistema nervioso de langosta, la enzima alanilaminasintetasa adiciona alanina al grupo amino de las aminas o al grupo amino del sulfato conjugado de las aminas. Esta reacción requiere ATP con alanina para completar su actividad

(37). La formación de compuestos conjugados con sulfato y alanina se muestran en la fig. 5.

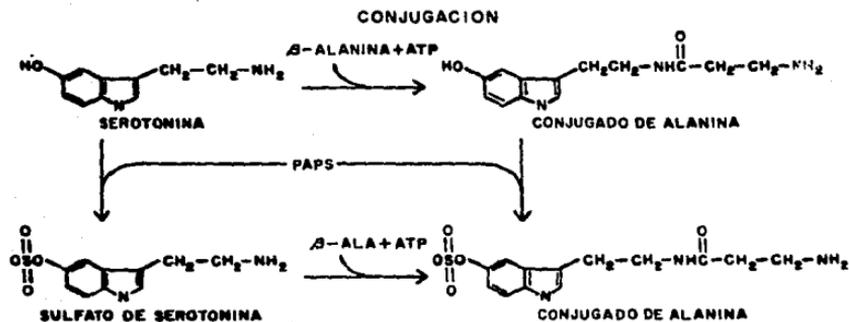


Fig. 5. Formación de conjugados en el sistema nervioso de la langosta.

2.4 FUNCIONES

La serotonina interviene en múltiples procesos fisiológicos. En vertebrados puede funcionar como hormona, la cual influye y modifica la secreción de una gran variedad de otras hormonas tales como la tirotrópina y la prolactina (7, 36), factores de liberación e inhibición hipotalámica, hormonas tróficas pituitarias y esteroides adrenales. Además posee propiedades vasoconstrictoras y de termoregulación corporal.

En invertebrados específicamente en langostas se sabe que la serotonina se encuentra presente en el músculo esquelético facilitando la contracción del músculo en preparaciones neuromusculares de crustáceos (27). Brundfest y Reuben (31), demuestran que la serotonina aumenta el tamaño del potencial de unión excitatorio produciendo potenciales de acción en fibras musculares y Dudel confirma que este aumento es de origen presináptico (13). Posteriormente se sabe que la serotonina actúa también en terminales nerviosas excitatorias e inhibitorias y sobre fibras musculares.

Asimismo Fischer y Florey confirman su acción en la modulación de la transmisión sináptica y en la excitación-contracción del músculo aductor del cangrejo (27). Livingstone y colaboradores inyectaron serotonina dentro de la circulación de cangrejos y langostas observando que ésta produce flexión prolongada de las extremidades y el abdomen, los cuales no son debidos a acciones periféricas sino a patrones motores coordinados (33), que envuelven la activación e inhibición de

múltiples motoneuronas excitatorias e inhibitorias que inervan los músculos posturales de la langosta (43).

Por otra parte se sabe que la serotonina a una concentración de 10^{-5} M en el crustáceo decápodo *Panulirus interruptus* incrementa la frecuencia del ciclo pilórico alrededor de un 50% de su actividad normal y produce una combinación de efectos excitatorios e inhibitorios sobre las neuronas pilóricas (28).

Recientemente se ha propuesto la participación de la serotonina y otras aminas como importantes moduladores fisiológicos de la conducta en crustáceos (40).

En suma, este agente tiene una gran importancia clínica y funcional ya que interviene en varios procesos fisiológicos que son esenciales para el organismo de vertebrados e invertebrados, razón por la cual se le ha investigado continuamente desde su descubrimiento hasta nuestros días.

2.5 LOCALIZACION DE LA SEROTONINA EN CRUSTACEOS

En la década de los 60's se realizaron los primeros estudios guiados a dilucidar la localización de las monoaminas en el sistema nervioso central de crustáceos. El método de fluorescencia histoquímica realizado en ese entonces permitió determinar a las catecolaminas e indolaminas en estas estructuras, gracias a que estas forman compuestos que fluorescen intensamente al ser tratados con vapor de formaldehído (24). Eloffson mediante esta técnica localizó neuronas en el sistema nervioso central situadas en el protocerebro, la médula externa e

interna así como la cadena ganglionar de la especie *Astacus astacus* (15). Estas investigaciones son ampliadas poco después al comprobar la existencia de estas aminas en 10 especies de crustáceos y 8 de insectos (16). Sin embargo la serotonina se determinó con precisión únicamente en insectos.

La identificación y localización de las presuntas neuronas serotoninérgicas (5-hidroxitriptaminérgicas) no se podía establecer con precisión debido a la intensa fluorescencia verde de las catecolaminas, que enmascaraba la fluorescencia amarilla de las indolalquilaminas.

Con el advenimiento de la inmunocitoquímica fué posible iniciar la localización de sustancias neuroactivas por el uso de antisueros contra su enzima sintética. La detección inmunocitoquímica directa de la serotonina es realizada por Eloffson en 1983 (17). Dicha técnica permite localizar las neuronas inmunorreactivas a serotonina, haciendo posible su ubicación en el sistema nervioso central.

Las neuronas inmunorreactivas en el sistema nervioso del acocil, se encuentran en los tres ganglios ópticos a saber: médula externa, interna y terminal del tallo ocular y las áreas inmunorreactivas del cerebro comprenden el puente protocerebral, el cuerpo central, los lóbulos paracentrales y los lóbulos olfatorios. En las figs. 6 y 7 se muestra la anatomía del tallo ocular.

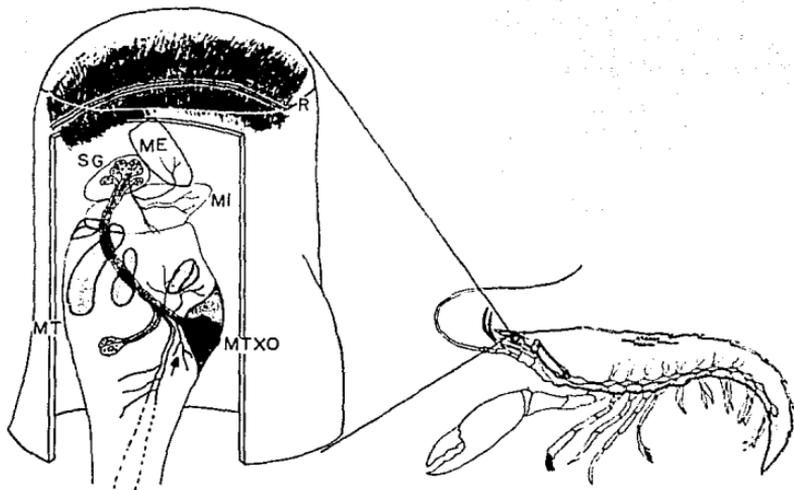


Fig. 6 Diagrama del tallo ocular del acocil *Procamburus clarkii*.

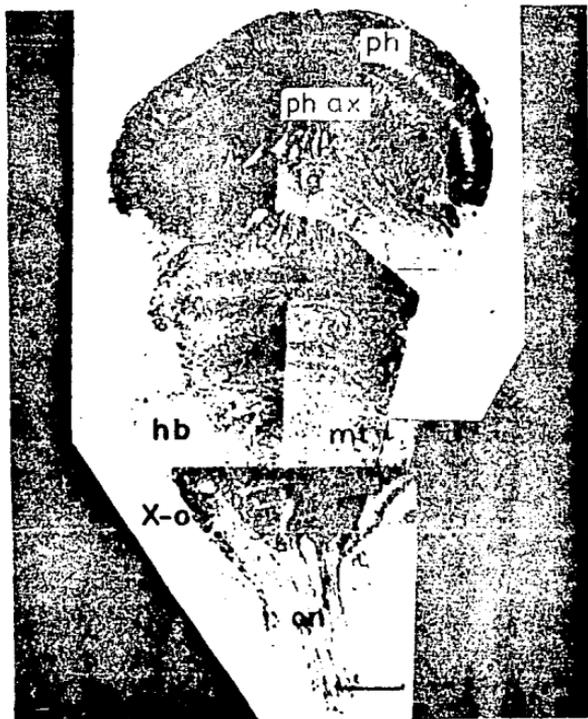


Fig. 7. Corte histológico longitudinal del tallo ocular completo de *Procambarus clarki* donde se muestran la retina y los diferentes lóbulos ópticos o neuropilas que lo conforman. ph, fotoreceptores en la retina; ph ax, axones de los fotoreceptores; lg, lamina ganglionaris; me, medulla externa; mi, medulla interna; mt, medulla terminalis; hb, cuerpo hemielipsoidal; o-X, órgano-X. Barra de calibración: 150 um.

Fingerman y colaboradores determinaron la cantidad de serotonina en el ganglio cerebroide y los tallos oculares del sistema nervioso del cangrejo *Uca pugilator* (25), mostrando más tarde que aquella cantidad presentó variaciones durante el día y la noche (circádicas) (26).

Posteriormente se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección electroquímica (DE), para identificar y cuantificar a la serotonina en el sistema nervioso (ganglio cerebroide y tallos oculares) del acocil *Pacifastacus leniusculus* (18). En 1984 Laxayr detecta serotonina en 6 especies diferentes de crustáceos decápodos utilizando los mismos procedimientos (42).

En el presente trabajo nos concretamos a la región más externa del sistema nervioso central, ya que a pesar de saber que la serotonina se encuentra en el tallo ocular de insectos y crustáceos no se conoce el papel fisiológico de los diversos elementos serotoninérgicos en el pedúnculo ocular de los crustáceos y demás artrópodos, en particular no se conoce cual es su influencia sobre el procesamiento de la información visual en estas especies.

2.5.1 La serotonina en el tallo ocular

Estudios inauocitoquímicos realizados por Elofsson en 1983 (19), muestran que el tallo ocular contiene cuatro neuropilas ópticas o regiones sinápticas. La más distal de las neuropilas denominada lámina ganglionar no contiene neuronas

inmunorreactivas. La siguiente neuropila en dirección proximal llamada médula externa (medulla), presenta fibras inmunorreactivas que se distribuyen en tres capas: una banda ancha en el margen distal, una segunda banda ancha en la mitad de la neuropila y una delgada en el margen proximal. La inmunorreactividad está caracterizada por tener una apariencia granular fina, que indica ramificaciones de las neuronas. La fluorescencia es más débil en las dos neuropilas más proximales.

La médula interna (lóbula) es proximal a las dos zonas antes mencionadas. En esta región las zonas inmunorreactivas se encuentran distribuidas en capas bien delimitadas que muestran interconexiones inmunorreactivas extensivas. Tal es el caso de la capa proximal que está dividida en dos subcapas, sin embargo sus ramificaciones son menores que en la médula externa.

La médula terminal es la más larga y proximal de las neuropilas del tallo y continúa al cerebro mediante el nervio óptico. El paquete de la superficie anterior de la neuropila tiene una región dorsomedial que rodea al llamado cuerpo hemielipsoidal. Las neuronas inmunorreactivas se encuentran principalmente en tres sitios de acumulación: uno anterior, el segundo caudal al cuerpo hemielipsoidal y el tercero situado ventrolateralmente sobre la superficie anterior de la neuropila.

Una zona intensamente inmunorreactiva de la neuropila se localiza inmediatamente abajo de las neuronas situadas en posición anterior al cuerpo hemielipsoidal. Esta concentración inmunorreactiva continúa a lo largo del borde medial de la médula

terminal y da lugar a axones fuertemente inmunorreactivos en el pedúnculo óptico, terminando en el sitio anterior del protocerebro.

Estudios inmunocitoquímicos realizados por Picones y Becerra (52), muestran que la serotonina se encuentra a lo largo del tallo ocular distribuido en la médula externa, interna y terminal (ver fig. 8), lo cual corrobora los resultados presentados por Elofsson en 1983 (19). Asimismo se indica por primera vez a la lámina ganglionar como neuropila que contiene fibras inmunorreactivas a serotonina cuando se realiza la disección y fijación del tejido alrededor de la medianoche, tomando en cuenta que la serotonina se encuentra en mayor cantidad a esta hora del día según la caracterización del ciclo circádico de la serotonina realizado en el cangrejo *Uca pugilator* por Fingerman y cols. (26).

El hecho de encontrar marca inmunorreactiva a serotonina en la lámina ganglionar (neuropila más próxima a los fotoreceptores) parece indicar el efecto directo de éste agente sobre los fotoreceptores del acócil.

Por otra parte se observan también fibras con depósitos inmunomarcados en el interior de fibras no asociadas con axones de fotoreceptores. La aparición de estructuras inmunorreactivas de 60 a 80 nm de diámetro sugiere la identificación de vesículas densas contenedoras de serotonina, con una posible función secretora al liberar localmente su contenido sobre los fotoreceptores. De tal forma que su localización en las



Fig. 8 Estudio inmunocitoquímico en el tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii*. En el se distingue una compleja marca inmunorreactiva en el nervio óptico, médula terminal, médula interna, médula externa, médula interna, y se observa por primera vez fibras inmunorreactivas en la lámina ganglionar (ver Picones, A.M., 1988)

estructuras del tallo ocular del acodil sugiere su muy probable participación en el procesamiento de la información visual e incluso la regulación de neuronas secretoras que en él se encuentran (órgano X) (52).

Si bien se han detectado y localizado los elementos serotoninérgicos en el tallo ocular, no se ha cuantificado aún la concentración de este agente en las diferentes regiones anatómicas del mismo, por lo tanto se pretende desarrollar un método cromatográfico que sea preciso, específico, sensible, reproducible y lineal que nos permita detectar a la serotonina en el tallo ocular, en las diferentes regiones anatómicas del mismo y las variaciones de ésta durante el ciclo nictameral con un mínimo de material biológico, un máximo rendimiento durante las extracciones y un bajo gasto de solventes, consecuentemente un menor costo en el análisis. Para ello es necesario consultar los métodos que se han utilizado hasta el momento para su determinación.

2.6 METODOS DE DETECCION Y DETERMINACION

Los métodos utilizados en la determinación de serotonina abarcan desde el análisis espectrofluorométrico (60) hasta el más sencillo y específico método cromatográfico (51).

El método espectrofluorométrico permitió determinar a la serotonina en 7 especies de crustáceos, encontrando una concentración de serotonina entre 0.02 a 0.2 ug/g de tejido, sin embargo se presentan interferencias con sustancias desconocidas

que fluorescen cerca de los 450 nm cuando son excitados a 305 nm y algunas veces enmascaran el pico de la serotonina cuando los niveles son muy bajos.

Después de la introducción de la técnica de fluorescencia histoquímica (24) se clasifica a las indolalquilaminas como parte de las monoaminas biogénicas incluyendo a la serotonina. Aunque si bien el método se utilizó para determinar la presencia de monoaminas en el sistema nervioso central de 8 especies de crustáceos decápodos y en insectos (16), éste presenta grandes desventajas: es una técnica muy elaborada, el tejido difícilmente se puede preservar después del tratamiento con vapores de formaldehído, la fluorescencia obtenida desaparece rápidamente cuando se expone a luz ultravioleta y además la presencia de serotonina (fluorescencia amarilla) es enmascarada por la presencia de las catecolaminas (fluorescencia verde) cuando estas se presentan en las mismas regiones anatómicas.

Sin embargo, en su momento fué una técnica muy utilizada para la localización de monoaminas en el sistema nervioso central de decápodos crustáceos.

Con el advenimiento de la inmunocitoquímica es posible detectar a las neuronas serotoninérgicas por el uso de antisueros contra su enzima biosintética, triptofano hidroxilasa y la descarboxilasa aromática ácida. Más recientemente se emplean anticuerpos contra serotonina permitiendo la identificación directa de las neuronas que la contienen y superando las limitaciones encontradas con el método de fluorescencia

histoquímica (8,19,52). Para la localización de terminales nerviosas se ha utilizado también el análisis radioenzimático (44).

Una vez determinada la posible localización de las neuronas serotoninérgicas, surge la necesidad de cuantificarla en el sistema nervioso central. La cromatografía en sus diversas facetas se ha utilizado también como medio para cuantificarla en diferentes regiones anatómicas.

Los primeros métodos de cromatografía de gases emplearon el detector de captura de electrones, el cual no es muy popular debido a los problemas asociados con la derivación de complejas matrices biológicas. En este procedimiento las aminas son tratadas con anhídridos halogenados obteniendo un derivado volátil que posee excelentes propiedades de captura de electrones. Aunque si bien la sensibilidad absoluta de este detector es alta, ésta disminuye debido a la señal de fondo producida por los reactivos de derivación, los solventes y los contaminantes de la matriz biológica. Martin y Ansel detectan no menos de 10 ng de serotonina en muestras de alrededor de 450 mg (47).

La cromatografía de gases asociada con un detector de espectrometría de masas, considerado como un detector altamente especializado para el cromatografo de gases, ofrece las siguientes ventajas: la muestra no tiene que estar altamente purificada cuando solamente ciertos iones son de interés, los compuestos de referencia deuterados se comportan como los

análogos no deuterados, considerándose entonces de alta precisión. Con anhídridos halogenados como los reactivos de derivación, se obtienen excelentes patrones de fragmentación con iones moleculares prominentes, sin embargo existen problemas asociados con el costo de la instrumentación así como de la mano de obra para su desempeño.

La cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa ofrece otro método para evitar los problemas asociados con los métodos anteriormente descritos. Esta técnica es idealmente adecuada para la determinación de moléculas biológicas termolábiles proporcionando una alta resolución, estabilidad de la columna, eficiencia y rapidez en el análisis, y la posibilidad de separar una amplia gama de compuestos a través del uso de un equilibrio secundario (6). Sin embargo esta puede extenderse a la investigación de aminas después de la introducción de detectores altamente sensibles tales como el detector de fluorescencia (51,58,59) y el detector electroquímico (18,42).

Basado en evaluaciones de sensibilidad, reproducibilidad, estabilidad, selectividad y simplicidad en el manejo del sistema se concluye que el detector de fluorescencia es superior al detector electroquímico. Las razones se exponen a continuación.

La detección electroquímica de indoles implica la N-oxidación y oxidación de los grupos fenoles de los compuestos 5-hidroxilados. La 5-hidroxitriptamina (serotonina), 5-hidroxitriptofano y el ácido 5-hidroxiindolacético muestran una corriente estable a 0.6 v y un incremento en la corriente por

aumento del potencial. Los compuestos sin el grupo fenol tales como el triptofano y la triptamina no dan un límite de corriente a potenciales de 1.10 v, por lo tanto los altos potenciales traen como consecuencia una elevada señal de ruido. El límite de la corriente para la oxidación de indoles puede no estar comprendida en el intervalo de voltaje del electrodo de carbón, consecuentemente la respuesta del detector esta en función del control del potencial utilizado (55).

Un problema constante con la detección electroquímica es la baja estabilidad y las fuentes no identificables de ruido a altas sensibilidades. En consecuencia es difícil establecer el límite de detección absoluto en el ensayo. A niveles de 50 ng se obtiene una precisión relativa superior al 1%, pero con cantidades menores de 1 ng a alta sensibilidad, la reproducibilidad no es satisfactoria para el análisis cuantitativo.

La detección por medio de fluorescencia fué posible debido a que las indolaminas exhiben una fluorescencia nativa cuando se excitan a una longitud de onda de 280 nm teniendo un máximo de emisión entre 335-340 nm para la serotonina y a 350 nm para la triptamina. En estas condiciones la máxima sensibilidad se determina entre 0.03-0.2 ng. Al cambiar la longitud de onda de emisión de 340 a 315 nm hay una fuerte supresión del pico de la serotonina y la sensibilidad del análisis disminuye. La linealidad se encuentra entre 0.1-0.5 ng a alta sensibilidad (55).

Puede aumentarse la sensibilidad del análisis, haciendo más fluorescente a la molécula, empleando reactivos de derivación como: la fluorescamina, el cloruro de dansilo, el ortoftaldehido y la etilendiamina. Las reacciones se pueden llevar a cabo por diferentes caminos:

a) Derivación precolumna. La reacción se lleva a cabo antes de la cromatografía o en un reactor específico entre el inyector y la columna.

b) Derivación postcolumna. La reacción se lleva a cabo en fracciones recolectadas después de la cromatografía o en un reactor designado específicamente para ello, situado entre la salida de la columna y el detector.

III OBJETIVOS

Objetivo general:

Desarrollar un método cromatográfico que permita detectar y determinar pequeñas cantidades de serotonina en el sistema nervioso del acocil *Procambarus clarkii* por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia.

Objetivos particulares:

- a) Establecer las condiciones óptimas del análisis cromatográfico (fase móvil y velocidad de flujo).
- b) Determinar la precisión, exactitud, reproducibilidad, linealidad del sistema, linealidad del método y límites de detección del sistema cromatográfico encontrado.
- c) Determinar la concentración de serotonina en el tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii*.
- d) Caracterizar las variaciones en la concentración de serotonina a lo largo del ciclo de 24 horas.
- e) Determinar la cantidad de serotonina en el tallo ocular completo, así como en sus diferentes regiones anatómicas.

IV DEBARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Condiciones de trabajo.

4.1.1 Espectro de fluorescencia de la serotonina.

Para establecer las condiciones óptimas de trabajo se realizó primeramente un espectro de excitación-emisión de la serotonina a una concentración de 2.05×10^{-4} g/ml en un espectrofluorómetro Aminco Bowman en las siguientes condiciones de operación: sensibilidad de cero, el porcentaje total de la escala en 100 y el monocromador en 0.5.

De la solución anteriormente preparada se introducen 2 ml en una celda de cuarzo, se fija la longitud de onda de excitación a 310 nm y se realiza un barrido de la longitud de onda de 310 a 430 nm obteniéndose el máximo de emisión a 340 nm (ver fig. 9). Posteriormente se fija la longitud de onda de emisión en 340 nm y se realiza un barrido de la longitud de onda de 220 a 370 nm encontrándose el máximo de excitación a 320 nm (ver fig. 9).

Lo anterior se lleva a cabo con el fin de fijar la longitud de onda a la cual se presenta el máximo de fluorescencia, en estas condiciones obtendremos un máximo de sensibilidad con una mínima cantidad de serotonina. Los filtros disponibles en el laboratorio son de 254, 338 y 450 nm por lo que se decidió colocar el filtro de 254 nm como la longitud de onda de excitación y el filtro de 338 nm como la longitud de onda de emisión, basando ésta elección en los resultados obtenidos en este trabajo y en los encontrados por Svendsen y Greibrokk (55),

en los cuales se obtiene una sensibilidad de 0.03 a 0.2 nm de serotonina con una longitud de onda de excitación de 280 nm y una longitud de onda de emisión de 340 nm. Los datos se muestran en la tabla 1 y 2, y la gráfica en la fig. 9.

4.1.2 Fases móviles encontradas.

Fase móvil 1. La fase móvil es una mezcla de 150 ml de 2-propanol, 370 mg de 1-octan sulfonato de sodio y 850 ml de acetato de amonio 0.01 M a pH = 4.5 (786 mg de acetato de amonio y 5.7 ml de ácido acético glacial por litro de solución).

Fase móvil 2. La fase móvil esta constituida de 800 ml de agua, 100 ml de acetato de amonio 0.1 M a pH = 4.5, 100 ml de acetonitrilo y 370 mg de 1 octan sulfonato de sodio.

Preparación de la fase móvil.

Para preparar la fase móvil se mide el agua tridestilada, des-ionizada, filtrada a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.45 μ m y desgasificada a vacío por 15 min; en otro contenedor se mide el amortiguador de acetatos, el 2-propanol y/o acetonitrilo y el octan sulfonato de sodio, los cuales se adicionan al primer contenedor agitando por 1 min a vacío para desgasificarla, finalmente se introduce el nitrógeno para conservar una atmósfera inerte. Todas las separaciones se llevan a cabo isocráticamente a una velocidad de flujo de 0.55 ml/min (fase móvil 1) ó a 0.8 ml/min (fase móvil 2) a temperatura ambiente.

4.1.3 Especificidad del método.

Para encontrar la especificidad del método cromatográfico se inyectaron 10 ul de diferentes solventes a saber: metanol, 2-propanol, butanol, n-heptano y acetoniitrilo, así como 10 ul de 1-arterenol, dopamina, 3,4 dihidroxibencilamina, 1 dopa, di-octopamina, 5 ul de los precursores di- triptano y l-tirosina a una concentración de 28.9 pmol/5ul y 5 ul de 6-hidroxi-melatonina a una concentración de 26.27 +/- 7.58 pmol/5 ul sin encontrar perturbación de la línea base en ninguna de las dos fases móviles utilizadas. La serotonina, melatonina, 5-hidroxitriptofano, 5-hidroxitriptofol y la N-acetilserotonina presentan señal cromatográfica en ambas fases, en la primera sin tener resolución entre ellas, no así para la segunda fase móvil donde presentan una buena resolución. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Las soluciones madre se preparan tomando 20 mg de cada estándar en 100 ml de metanol con 500 ul de 2-mercaptostanol y 500 ul de ácido perclórico aforándolo en frío. La concentración es de 2.05×10^{-4} g/ml almacenándose a una temperatura de -4 C.

4.2 Validación

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas se procedió a validar el método, para ello se realizaron las siguientes determinaciones:

4.2.1 Precisión y exactitud. Se llevaron a cabo 20 determinaciones de serotonina a una concentración de 28.9 pmol/5

ul, la cual se consideró como el 100%. Los resultados se muestran en la tabla 4.

4.2.2 Reproducibilidad. Se realizaron 30 determinaciones de serotonina a una concentración de 28.9 pmol/5 ul para caracterizar el efecto del día y el efecto del analista en la cuantificación (2 días y 2 analistas). Los datos se muestran en las tablas 5 y 6.

4.2.3 Linealidad del sistema. En este punto se elaboraron curvas de calibración para caracterizar la altura en función de la concentración de la serotonina. Dichas curvas abarcan de 5.65 a 70.0 pmol/5 ul. Cada una de estas soluciones se inyectó por cuadruplicado para determinar el límite de detección (X_d), el límite de decisión (Y_d) y la linealidad del sistema. En la tabla 7 se muestra la altura promedio de 4 determinaciones de cada una de las concentraciones utilizadas. La gráfica se muestra en la fig. 10.

4.2.4 Linealidad del método. Se realizó un homogenado de 48 tallos oculares con 6 ml de ácido perclórico 0.2 N con heparina sodica, el cual se fraccionó en alícuotas de 500 ul obteniéndose un total de 12 muestras que se agrupan en 4 lotes de 3 muestras cada uno. El primer lote es el de las muestras testigo y a los 3 lotes restantes se les adiciona 22.2 pmol/5 ul, 29.64 pmol/5 ul y 49.29 pmol/5ul de serotonina estándar continuando el proceso de extracción anteriormente descrito (ver inciso 4.3.2). Los resultados se muestran en la tabla 8 y la gráfica se muestra en la fig. 11.

4.3 Tratamiento de las muestras biológicas

4.3.1 Disección del tejido.

Después de validar el sistema se procedió a tratar muestras biológicas para determinar la aplicabilidad del método en la cuantificación de serotonina en el tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii*. La preparación de las muestras se describe a continuación.

El tejido nervioso se obtiene de acociles *Procambarus clarkii* (Birard, Crustacea, Decapoda) de 8 a 9 cm de longitud y de 20 a 30 g en edad adulta, sin distinción de sexos y solo aquellos que no se encuentren en periodo de muda, traídos desde su habitat natural en el estado de Chihuahua. Los animales permanecían al menos una semana adaptándose a las condiciones del laboratorio en bandejas de plástico con agua y un ciclo alternado de luz-obscuridad 12:12.

La solución utilizada para las disecciones fué la solución fisiológica para crustáceos dulcesacuícolas de Van Harreveld con la siguiente composición iónica en mmol/lit : NaCl 205, KCl 5, CaCl₂ 14, MgCl₂ 3, Hapes Na 2; el pH se ajustó a 7.4.

Para realizar la disección del tallo ocular se corta primero el rostrum y después se extirpa el tallo ocular, que se recibe en una caja de petri con solución Van Harreveld y con ayuda de un microscopio se procede a cortar el exoesqueleto (llevando a cabo cuatro incisiones en forma radial), así como los músculos oculomotores para posteriormente sacar el tallo ocular auxiliándose con pinzas de relojero, por último se extirpa el

tejido conectivo que lo rodea.

4.3.2 Método de extracción.

El método de extracción es una técnica modificada realizada a partir de las observaciones realizadas por Elofsson, Palmerini y Wakabayashi (18,42,51,58,59), en el cual el tallo ocular aislado se congela en hielo seco, se pesa e inmediatamente se homogeniza en un micropotter de vidrio con 500 μ l de heparina sódica en ácido perclórico (10 mg de heparina sódica disuelta en 10 ml de ácido perclórico 0.2 N), después se centrifuga a 17000 rpm durante 20 min a 2°C en una centrifuga refrigerante, el sobrenadante se transfiere a otro tubo para su posterior filtración a través de filtros de Nylon 66 con un tamaño de poro de 0.2 μ m. El volumen total obtenido de la muestra es inyectado dentro del sistema cromatográfico. El diagrama del proceso de extracción se muestra en la fig. 12

METODO DE EXTRACCION

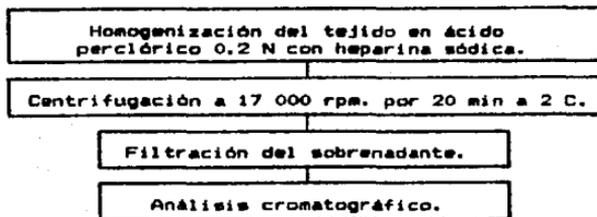


Fig. 12 Proceso de extracción para las muestras biológicas.

4.3.3 Porcentaje de recuperación en la extracción.

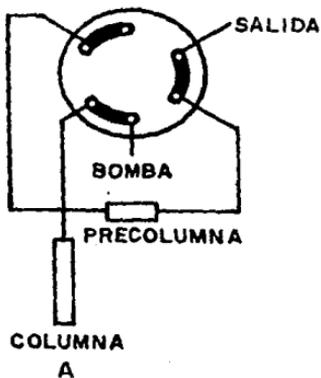
Se inyectan 5 μ l de serotonina estándar a una concentración de 28.9 pmol/5 μ l y 10 μ l de melatonina a una concentración de 43.267 pmol/10 μ l para calibrar el sistema cromatográfico. En la tabla 9 y en la fig. 14 se indica el tiempo de retención, la altura y la concentración correspondiente de estos estándares.

Por otra parte la misma mezcla de estándares se procesa como se describe en el inciso 4.3.2 y se inyecta al cromatógrafo para cuantificar el porcentaje de recuperación de la serotonina durante el proceso de extracción. Los resultados se muestran en la tabla 10.

4.4 Análisis cromatográfico.

Al iniciar el análisis, con la válvula en posición de carga (fig. 13 A), se inyectan 2 ml de agua dentro de la precolumna a través de una aguja por utilización de una jeringa de 5 ml adaptada a un filtro Millex-GB con un tamaño de poro de 0.22 μ m. En este momento, la muestra, usualmente de 0.1 a 0.5 ml se inyecta y finalmente la manija de la válvula se rota a la posición de inyección (fig. 13 B) para iniciar la fase de elución de la bomba a la terminal opuesta de la precolumna y determinando la muestra arrastrada dentro de la columna analítica.

ENTRADA AL INYECTOR



ENTRADA AL INYECTOR

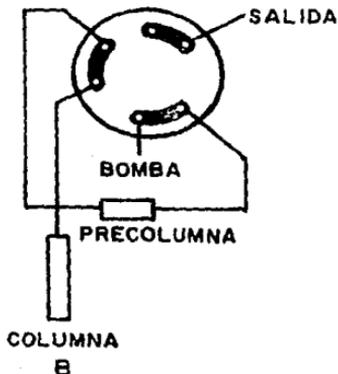


Fig. 13 El esquema muestra el análisis cromatográfico de la serotonina. Con la válvula en posición de carga (A), la muestra se inyecta dentro de la precolumna reteniéndose en esta el compuesto de interés. Los compuestos que no se retienen en la precolumna son eliminados por medio de un lavado de agua y finalmente los compuestos adsorbidos son impulsados de la precolumna a la columna analítica cuando la válvula se coloca en posición de inyección.

4.5 Cuantificación de la serotonina en el tallo ocular

Se toman 3 muestras de cuatro tallos oculares cada una, las cuales son tratadas con el mismo proceso de extracción (ver inciso 4.3.2), sin embargo en la muestra 1 se procesa el tejido nervioso únicamente, en la muestra 2 se adicionan 5 ul de serotonina estándar a una concentración de 28.90 pmol/5 ul y en la última muestra se adicionan 10 ul de melatonina a una concentración de 43.267 pmol/ 10 ul. Los datos se muestran en la tabla 11 y los cromatogramas en la fig. 15 A, 15 B, 15 C.

4.6 Identificación de la serotonina.

4.6.1 Modificación de las variables cromatográficas.

Es probable que en las condiciones de flujo y fase móvil utilizadas exista otro compuesto que presente el mismo tiempo de retención que la serotonina, por ello se modifican las condiciones cromatográficas utilizadas hasta el momento, fase móvil 1 a una velocidad de 0.55 ml/min, por la fase móvil 2 a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min.

Para calibrar el sistema cromatográfico se inyectan 5 ul de una mezcla de estándares que contiene 28.67 pmol/5ul de 5-hidroxitriptamina (serotonina) (5-HT), 24.15 pmol/5 ul de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) (precursor de la serotonina), 27.47 pmol/5 ul de 5-hidroxitriptofol (5-HTPH), 23.02 pmol/5 ul de N-acetilserotonina (N-acetil 5-HT) y 57.31 pmol/5 ul de melatonina (MEL) (Los últimos 3 son metabolitos de la serotonina). Los resultados se muestran en la tabla 12 y en la fig. 16 se muestra el cromatograma de los mismos.

4.6.2 Cuantificación de la serotonina en el tallo ocular.

Para la identificación del pico de la serotonina se toman 3 muestras de 4 tallos oculares cada una y se procesan como ya se ha descrito, y el análisis cromatográfico se lleva a cabo con la fase móvil 2 a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min. En la fig. 17 se muestran los resultados y un cromatograma ilustrativo de las mismas.

4.7 Experimentos fisiológicos

4.7.1 Determinación del ciclo circádico de la serotonina.

Fingerman y Fingerman describen el ciclo circádico de la serotonina en el cangrejo *Uca pugilator*, sin embargo no se sabe si en el acocil *Procambarus clarkii* exista tal ritmicidad circádica, por lo tanto se procede a determinar las variaciones de la serotonina en el transcurso del ciclo nictameral. Para ello se tomaron tres muestras de cuatro tallos oculares a las 6:00, 12:00, 18:00 y 24:00 horas del día considerando la iluminación de acuerdo al ciclo circádico, es decir, durante las 12 horas de luz la disección se realiza con luz blanca y el las 12 horas de oscuridad se lleva a cabo con luz roja tenue.

Los resultados se muestran en la tabla 13 y en la fig. 18 se encuentra la gráfica que indica las variaciones en la concentración de serotonina, 5-hidroxitriptofano, 5-hidroxitriptofol y N-acetilserotonina durante un ciclo nictameral, los cuales se reportan considerando la máxima concentración de cada una como el 100%

4.7.2 Distribución de la serotonina en el tallo ocular.

Posteriormente se cuantifica la concentración de la serotonina en las diferentes regiones anatómicas, para ello se realizaron las disecciones alrededor de la medianoche de las siguientes fracciones a saber: retina-lamina ganglionar (R-LB), médula externa (ME), médula interna (MI), médula terminal-nervio óptico (MT-NO) y glándula sinusal (GS).

Con ayuda de un microscopio y en condiciones de iluminación muy tenues (luz roja), con el objeto de no modificar el ciclo circádico de la serotonina, se obtienen 20 fracciones de cada una de estas zonas, las cuales son procesadas y analizadas como se indica anteriormente (ver inciso 4.3.2 y 4.4). Los datos se muestran en la tabla 14 y en la fig. 19 se indica la distribución de la serotonina, su precursor y sus metabolitos en las diferentes regiones anatómicas del tallo ocular.

V RESULTADOS

5.1 Condiciones de trabajo.

La determinación de serotonina se llevó a cabo con dos fases móviles a una velocidad de flujo de 0.55 ml/min y 0.8 ml/min utilizando una longitud de onda de excitación de 254 nm y una longitud de onda de emisión de 338 nm. Lo anterior se determinó al realizar el espectro de fluorescencia y obtener que el máximo de emisión se encuentra a los 340 nm y el máximo de excitación a los 320 nm (ver tabla 1,2 y fig. 9).

Los parámetros de integración para todos los registros son: velocidad de la carta, $v = 0.33$ cm/min; ancho del pico, $w^* = 17$; nivel de ruido, $nr^* = 754$; el área del pico, $A^* = 20$. En estas condiciones el método cromatográfico resultó ser específico para la determinación de serotonina y melatonina (fase móvil 1), y para la serotonina, melatonina, 5-hidroxitriptofol, 5-hidroxitriptofano y N-acetilserotonina (fase móvil 2). (ver tabla 3).

5.2 Validación.

Para validar el sistema cromatográfico se realizaron 94 determinaciones, 20 para precisión y exactitud, 30 para reproducibilidad, 32 para linealidad del sistema y 12 para linealidad del método. Los resultados se muestran a continuación:

* Unidades del aparato.

a) En las determinaciones de precisión y exactitud (ver la tabla 4) el valor de la media es de 99.81 con una desviación estándar de 0.623 y un coeficiente de variación del 0.624 %. El intervalo de confianza abarca desde 99.5187 hasta 100.1012.

b) De las 30 determinaciones de reproducibilidad, 15 determinan el efecto del día y 15 el efecto del analista. Al evaluar el efecto del día (tabla 5), se observa que la desviación estándar más pequeña corresponde al día 3 ($\sigma = 0.38$) y la más grande al día 2 ($\sigma = 0.48$), sin embargo podemos afirmar que los valores obtenidos no sufren una desviación significativa al ser analizados en diferentes días. Al evaluar el efecto del analista observamos que la desviación varía de 0.47 a 0.65, presentando una media entre 99.36 y 99.94, de tal forma que podemos decir que la determinación de serotonina se puede realizar por diferentes analistas sin encontrar un cambio significativo en la concentración de la misma.

c) Para la linealidad de el sistema se realizaron 32 determinaciones (4 para cada una de las concentraciones trabajadas), es decir se cuantificó la respuesta del aparato (altura) en función de la concentración de serotonina (tabla 7 y fig. 10). Al graficar el valor promedio de cada concentración se observa dispersión a las concentraciones de 22.88, 28.90, 46.89 y 70.05 $\mu\text{mol/l}$, sin embargo la línea recta se trazó siguiendo la tendencia general de los puntos obtenidos.

La recta de regresión estimada por medio de mínimos cuadrados fué:

$$Y = 0.4327 X + (- 0.1862)$$

$$r = 0.9979$$

$$r^2 = 0.9958$$

Al trazar las bandas de confianza calculadas por medio de la desviación estándar por punto, se determina el límite de detección, $X_d = 7.5 \text{ pmol/5 ul}$ y límite de decisión, $Y_d = 15000$ unidades del aparato.

d) La linealidad del método se evalúa con 12 determinaciones (3 muestras para cada concentración y 3 muestras testigo). Los resultados en la tabla 8 muestran que el método cromatográfico es lineal a concentraciones de 22.2 pmol/5 ul , 29.64 pmol/5 ul y 49.29 pmol/5 ul . La recta de regresión calculada por mínimos cuadrados fué:

$$Y = 1.0938 X + (- 18.16)$$

$$r = 0.9999$$

$$r^2 = 0.9999$$

La validación del sistema nos permitió caracterizar parámetros muy importantes para la evaluación del sistema cromatográfico, de tal manera que sabemos que el método

desarrollado es exacto, preciso, reproducible, lineal a las concentraciones de 5.65 a 70.0 pmol/5 ul, el límite de detección es de 7.5 pmol /5 ul y el límite de decisión es de 15000 unidades del aparato. Sin embargo es importante demostrar la aplicabilidad del método en la determinación de serotonina en muestras biológicas, para ello se realizaron una serie de determinaciones en el tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii*, las cuales se muestran a continuación.

T A B L A 1

Espectro de emisión = 310 nm

| λ | I.F |
|-----------|------|
| 310 | 0 |
| 320 | 9 |
| 330 | 41 |
| 340 | 53.5 |
| 350 | 43.0 |
| 360 | 29.0 |
| 370 | 17.0 |
| 380 | 9.0 |
| 390 | 4.0 |
| 400 | 2.0 |
| 410 | 1.0 |
| 420 | 0.0 |

T A B L A 2

Espectro de excitación = 340 nm

| λ | I.F. |
|-----------|------|
| 220 | 0.0 |
| 230 | 0.5 |
| 240 | 2.0 |
| 250 | 5.0 |
| 260 | 8.5 |
| 270 | 10.0 |
| 280 | 13.0 |
| 290 | 21.0 |
| 300 | 31.0 |
| 310 | 50.0 |
| 320 | 54.0 |
| 330 | 30.0 |
| 340 | 5.0 |
| 350 | 1.5 |
| 360 | 0.5 |
| 370 | 0.0 |

I.F. = Intensidad de fluorescencia

λ = Longitud de onda

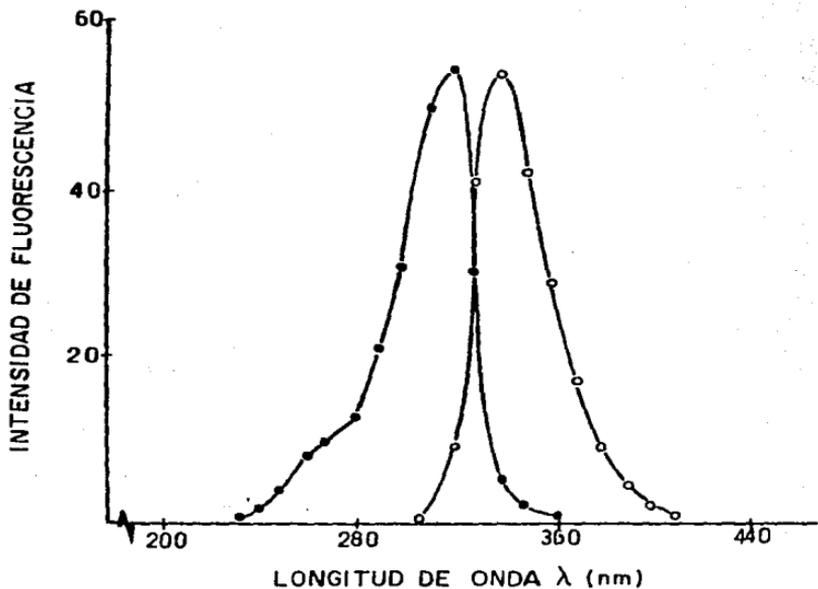


Fig. 9 Espectro de excitación-emisión de la serotonina a una concentración de 2.05×10^{-4} g/ml en un espectrofluorómetro Amino-Bowman.

T A B L A 3

Especificidad

Introducción de solventes Señal cromatográfica

- | | |
|-----------------|-----|
| 1. Metanol | - & |
| 2. Propanol | - " |
| 3. Butanol | - " |
| 4. n-heptano | - " |
| 5. Acetonitrilo | - " |

Introducción de aminas

- | | |
|-----------------------------|-----|
| 1. Arterenol | - * |
| 2. Dopamina | - " |
| 3. 3,4-dihidroxibencilamina | - " |
| 4. l-dopa | - " |
| 5. di-octopamina | - " |
| 6. Serotonina | + " |

Introducción de precursores

- | | |
|-----------------------------|-----|
| 1. dl-triptofano | - " |
| 2. l-tirosina | - " |
| 3. 5-hidroxi- l- triptofano | + " |

Introducción de metabolitos

- | | |
|-------------------------|-----|
| 1. N-acetilserotonina | + o |
| 2. 6-hidroxi melatonina | - " |
| 3. Melatonina | + * |
| 4. 5-hidroxitriptofol | + o |

& 10 ul de cada solvente.

* 10 ul de cada amina y precursor a una concentración de 28,9 pmol/5 ul.

o 5 ul de cada metabolito a una concentración de 26.27 +/- 7.58 pmol/5 ul.

Precisión y Exactitud

T A B L A 4

Porcentaje de recuperación
(100% = 28.9 pmol/5 ul)

100.59
100.00
100.09
100.47
99.52
99.95
99.07
98.96
98.92
100.01
100.72
100.19
98.58
100.43
99.83
100.28
99.99
99.11
100.20
99.31

Concentración teórica 28.9 pmol/5 ul

De acuerdo al anexo II fórmulas 1,4,6,8.

\bar{X} = 99.81 (Promedio de recuperación)
 σ = 0.623
CV = 0.624 %

Intervalo de confianzas:

$99.5187 \leq \bar{X} \leq 100.1012$

Con 95 % de confianza, 19 gl; t = 2.09

CRITERIO:

Precisión

CV \leq 2%

Precisión y Exactitud

\bar{X} = 98% - 102%

CV \leq 3%

Reproducibilidad

a).- Efecto del día.

T A B L A 5
Porcentaje de recuperación

| 1 | 2 | 3 |
|--------|--------|--------|
| 100.00 | 99.23 | 100.19 |
| 100.09 | 98.96 | 99.31 |
| 99.51 | 98.92 | 99.82 |
| 99.94 | 100.00 | 100.28 |
| 98.96 | 99.72 | 99.99 |

De acuerdo al anexo II fórmulas 1,2,6.

| | | |
|-------------------|--------|--------|
| $\bar{x} = 99.70$ | 99.37 | 99.92 |
| $\bar{y} = 0.47$ | 0.48 | 0.38 |
| $\sum x = 498.5$ | 496.83 | 499.59 |

De acuerdo al anexo III

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

$$F_0 = 1.9468$$

$$95\%$$

$$F = 3.89$$

$$(12,2)_{gl}$$

CRITERIO:

| | |
|--|------------------|
| $F_0 \leq F_{\alpha\%}$ (n)gl | Se acepta H_0 |
| $F_0 > F_{\alpha\%}$ (n)gl | Se rechaza H_0 |
| $F_0 \neq \pm F_{\alpha\%/2}$ (n)gl | Se rechaza H_0 |

$$n = (n^* - m, r)_{gl}$$

b).- Efecto analista

T A B L A 6
Porcentaje de recuperación

| 1 | 2 | 3 |
|--------|--------|--------|
| 99.96 | 99.25 | 100.00 |
| 99.95 | 98.95 | 100.09 |
| 99.98 | 99.14 | 99.51 |
| 100.76 | 100.50 | 99.94 |
| 99.07 | 98.97 | 98.96 |

De acuerdo al anexo II fórmulas 1,2,6.

| | | | |
|------------|----------|--------|--------|
| \bar{x} | = 99.94 | 99.36 | 99.70 |
| \sqrt{s} | = 0.60 | 0.65 | 0.47 |
| $\sum x$ | = 499.72 | 496.81 | 498.50 |

De acuerdo al anexo III

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

$$F_0 = 1.2838$$

$$F_{95\%} = 3.89$$

$$(12, 2)_{gl}$$

CRITERIO:

$$F_0 \leq F_{\alpha\%} \quad (n)_{gl} \quad \text{Se acepta } H_0$$

$$F_0 > F_{\alpha\%} \quad (n)_{gl} \quad \text{Se rechaza } H_0$$

$$F_0 \neq F_{\alpha\%/2} \quad (n)_{gl} \quad \text{Se rechaza } H_0$$

$$(n) = (n* - m, r)_{gl}$$

Linearidad

a) Linearidad del sistema.

T A B L A 7

Altura del pico en función de la concentración de serotonina.

| Concentración (pmol/5 ul) | Altura |
|------------------------------|--------|
| 5.645 | 28290 |
| 11.290 | 48943 |
| 16.930 | 72675 |
| 22.580 | 89877 |
| 28.900 | 121397 |
| 35.240 | 151923 |
| 46.890 | 190870 |
| 70.050 | 309073 |

De acuerdo al anexo II fórmulas 13,14 y 15.

b = - 0.1862 (ordenada al origen)
m = 0.4327 (pendiente).

La recta de regresión:

$$Y = 0.4327 X + (- 0.1862)$$

Estimación de la ordenada al origen (b), de acuerdo al anexo II fórmulas 9,11,12 y 17.

Ho : $b_0 = 0$
H1 : $b_1 \neq 0$

$t_c = 0.7127$

95%
 $t = 2.45$
(6)gl

CRITERIO:

$t_c < t_{(n)gl} \%$ Se acepta Ho

$t_c > t_{(n)gl} \%$ Se rechaza Ho

$t_c \neq \pm t_{(n)gl} \%/2$ Se rechaza Ho

(n) = (n* - 2)gl

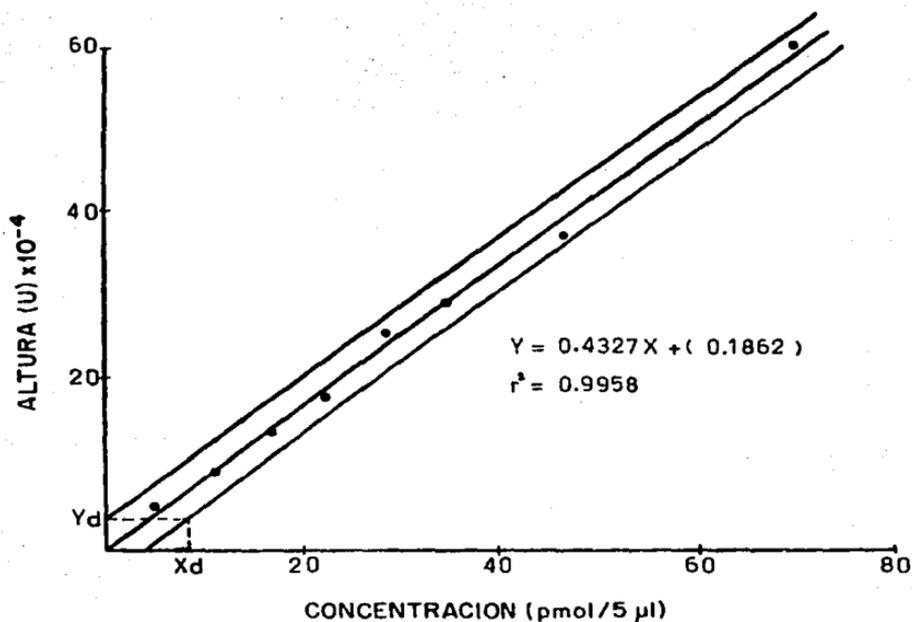


Fig. 10 Altura del pico en función de la concentración de serotonina. Las bandas de confianza se construyeron con un nivel de confianza del 95% y con 6 gl. El límite de detección, (Xd) y el límite de decisión, (Yd).

Estimación del coeficiente de correlación (r),
de acuerdo al anexo II fórmula 16.

$$r = 0.9979 \quad \text{y} \quad r^2 = 0.9958$$

b) Linearidad del método.

T A B L A B

% Adicionado % Recuperado
Tomando 29.64 pmol/5 ul como el 100%

| | |
|--------|--------------------|
| 74.89 | 70.42 |
| " | 65.43 |
| " | 54.06 |
| | $\bar{x} = 63.30$ |
| | $\bar{y} = 8.38$ |
| 100.00 | 92.43 |
| " | 92.05 |
| " | 90.77 |
| | $\bar{x} = 91.75$ |
| | $\bar{y} = 0.86$ |
| 166.13 | 170.32 |
| " | 156.65 |
| " | 163.29 |
| | $\bar{x} = 163.42$ |
| | $\bar{y} = 6.83$ |

De acuerdo al anexo II fórmulas 13, 14 y 15.

$$b = -18.16 \text{ (ordenada al origen)}$$

$$m = 1.0938 \text{ (pendiente)}$$

La recta de regresión:

$$Y = 1.0938 X + (-18.16)$$

Estimación de los parámetros de regresión.

Ordenada al origen (b) (De acuerdo al anexo II fórmulas 9,11,12 y 17).

$$H_0 : b_0 = 0$$

$$H_1 : b_1 \neq 0$$

$$t_c = -2.59$$

95%

$$t = 12.71$$

(1)gl

CRITERIO:

$$t_c < \frac{t}{(n)gl} \quad \text{Se acepta } H_0$$

$$t_c > \frac{t}{(n)gl} \quad \text{Se rechaza } H_0$$

$$t_c \neq \pm \frac{t}{(n)gl} \quad \text{Se rechaza } H_0$$

$$(n) = (n_0 - 2)gl$$

Pendiente (m) (De acuerdo al anexo II fórmulas 9,11 y 18).

$$H_0 : m_0 = 1$$

$$H_1 : m_1 \neq 1$$

$$t_c = 9.6968$$

95%

$$t = 12.71$$

(1)gl

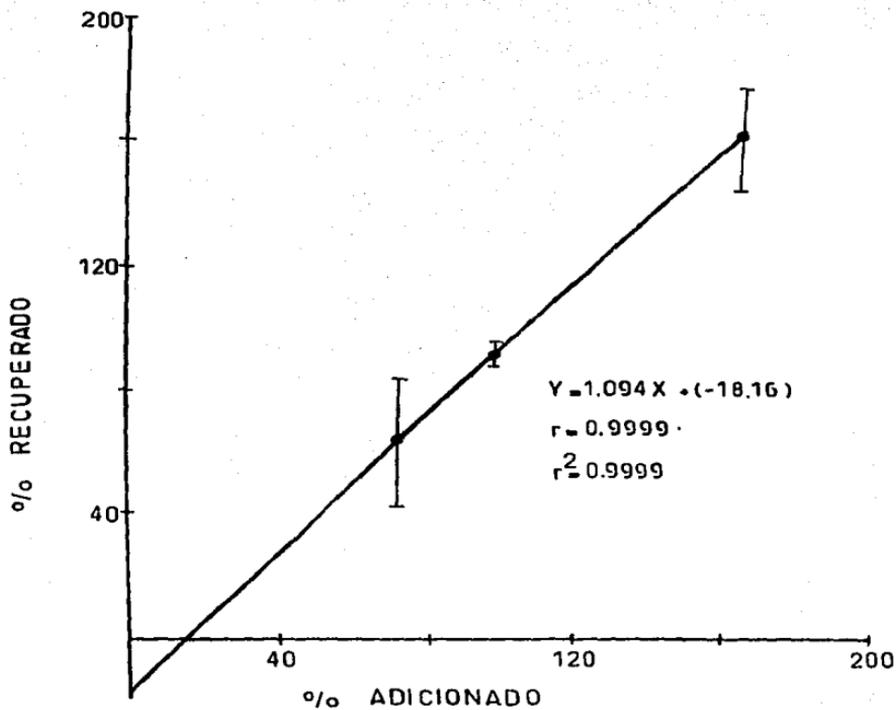


Fig. 11 % Recuperado en función del % Adicionado de serotonina. Los puntos graficados son el promedio de 3 determinaciones.

CRITERIO:

| | | |
|--------------|----------------------------|------------------|
| $t_c < t$ | $\alpha\%$ $(n-2)g_l$ | Se acepta H_0 |
| $t_c > t$ | $\alpha\%$ $(n-2)g_l$ | Se rechaza H_0 |
| $t_c \neq t$ | $\alpha\%/2$ $(n-2)g_l$ | Se rechaza H_0 |

Coefficiente de correlación (r), de acuerdo al anexo II fórmula 16.

$$r = 0.99996 \quad \text{y} \quad r^2 = 0.99992$$

5.3 Cuantificación de la serotonina en el tallo ocular.

En la calibración del sistema con la mezcla de estándares de serotonina y melatonina (ver fig. 14), se observa que la resolución entre ellos es de 2.52 (ver el anexo II, fórmula 20) y por lo tanto en caso de que la melatonina se encuentre en el tallo ocular, ésta aparecerá en el cromatograma con un tiempo de retención de 11.02

En la tabla 10 se puede observar que el porcentaje de recuperación de la serotonina durante el proceso de extracción es del 85.70 % al 91.86 % teniendo un valor promedio del 88.73 %.

En el cromatograma de la fig. 15 A encontramos únicamente el pico identificado como la serotonina con un tiempo de retención de 8.84, sin encontrar en éste ninguna evidencia de la presencia de melatonina endógena en el tejido nervioso. La concentración de serotonina encontrada en el tallo ocular completo es de 0.1146 ug

/ g tejido humedo (valor promedio de 3 determinaciones).

Una forma inmediata de identificar el pico de la serotonina es inyectando cierta cantidad de estándar, de tal forma que el pico debido a serotonina incremente su altura en función de la concentración de estándar adicionado.

En el cromatograma de la fig. 15 B se observa la muestra de tallo ocular con 28.90 pmol/5 μ l de estándar de serotonina adicionado. La única señal que incrementa su altura presenta un tiempo de retención de 8.86 confirmando así la identificación del pico de la serotonina.

En las dos muestras anteriores (15 A y 15 B) no se observa ninguna señal con un tiempo de retención de 11.02 por lo que puede suponerse que la melatonina no se encuentra en el tejido nervioso o que la concentración en la que se encuentra es muy pequeña de tal forma que no se detecta con el material biológico utilizado para las determinaciones de la serotonina (4 tallos oculares).

En el cromatograma de la fig. 15 C se muestra la presencia de melatonina con un tiempo de retención de 10.96 ya que ésta se ha inyectado previamente a la muestra biológica y no por que se encuentre en forma endógena en el tallo ocular. Finalmente podemos decir que la melatonina no se encuentra en el tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii* ó que se encuentra en bajas concentraciones no detectables por este método.

T A B L A 9

Calibración con estándares

| Estándar | t.r | Concentración | Altura |
|------------|-------|-----------------|--------|
| Serotonina | 8.92 | 28.90 pmol/5 ul | 106669 |
| Melatonina | 11.02 | 43.267pmol/5 ul | 166506 |



fig. 14 Cromatograma de la mezcla de estándares en la fase móvil 1 a una velocidad de 0.55 ml/min a temperatura ambiente. Los picos son debidos a serotonina, tr = 8.92 y melatonina, tr = 11.02.

T A B L A 10

Porcentaje de recuperación

| Estándar | t.r | Altura | % Recuperado |
|------------|------|--------|--------------|
| Serotonina | 8.50 | 94619 | 88.70 |
| Serotonina | 8.50 | 91389 | 85.67 |
| Serotonina | 8.65 | 97989 | 91.86 |

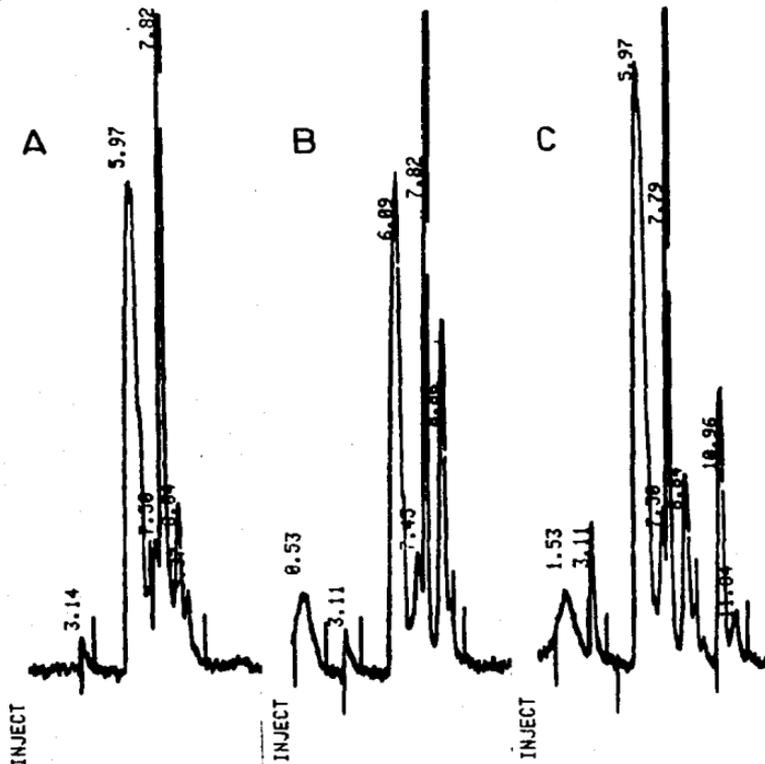


Fig. 15 A Cromatograma de la muestra de tallo ocular. El pico identificado como la serotonina (5-HT), $tr = 8.84$, es equivalente a $0.1094 \mu\text{g/g}$ de tejido húmedo y representa a la serotonina endógena en el tejido nervioso.

Fig. 15 B El pico identificado como la serotonina (5-HT), $tr = 8.84$, incrementa su señal cuando se adicionan $28.90 \text{ pmol}/5\mu\text{l}$ de serotonina estándar.

Fig. 15 C Adición de estándar de melatonina (MEL), a una concentración de $57.31 \text{ pmol}/10\mu\text{l}$. Los picos son debidos a serotonina endógena, $tr = 8.84$ y a melatonina exógena, $tr = 10.96$.

T A B L A 11

Cuantificación en tallo ocular

| Muestra | Substancia | t.r | Altura | Concentración |
|---------|------------|-------|--------|---------------|
| 1 | Serotonina | 8.84 | 81613 | 0.1074 ug/g |
| 2 | Serotonina | 8.86 | 82742 | 0.1109 ug/g |
| 3 | Serotonina | 8.84 | 92493 | 0.1237 ug/g |
| | Melatonina | 10.96 | 166506 | - |

5.4 Identificación de la serotonina.

Por otra parte es probable que en las condiciones de flujo y fase móvil utilizadas (0.55 ml/min, fase móvil 1) exista otro compuesto que presente el mismo tiempo de retención que la serotonina, por lo tanto es necesario cambiar las condiciones experimentales (fase móvil 2 a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min) y verificar posteriormente la identidad de la serotonina.

T A B L A 12

Precusores y metabolitos de la serotonina

| Estándar | t.r | Concentración | Altura |
|--------------|-------|------------------|--------|
| 5-HTP | 4.67 | 24.15 pmol/5 ul | 125706 |
| 5-HTPH | 5.75 | 27.47 " | 90917 |
| N-acetil-5HT | 6.77 | 23.02 " | 85346 |
| 5-HT | 7.67 | 28.67 " | 77410 |
| Melatonina | 15.30 | 57.31 pmol/10 ul | 63918 |

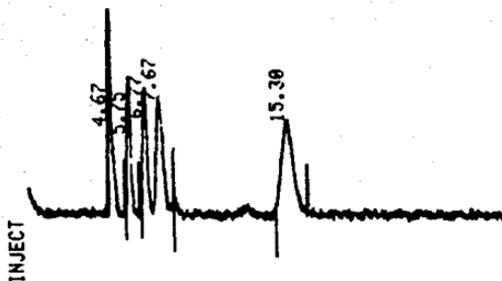


Fig. 16 Cromatograma de la mezcla de estándares en la fase móvil 2 a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min a temperatura ambiente. Los picos son debidos a 5-hidroxitriptofano (5-HTP), tr = 4.67; 5-hidroxitriptofol (5-HTPH), tr = 5.75; N-acetil serotonina (N-acetil 5-HT), tr = 6.67; serotonina (5-HT), tr = 7.67; melatonina (MEL), tr = 15.30.

La identificación de la serotonina en una segunda fase alternativa se muestra en el cromatograma de la fig. 17, en el se observa a la serotonina con un tiempo de retención de 8.44 que comparado con el estándar presenta una alteración con respecto al tiempo de retención de 7.67 a 8.44, lo anterior puede deberse al efecto de la matriz biológica únicamente. La concentración determinada para la serotonina en estas condiciones es de 0.083 +/- 0.014 ug/g de tejido humedo, presentando una altura de 61439 +/- 10829. Con lo anterior se corrobora la identificación del pico de la serotonina y la aplicabilidad del método queda comprobada.

5.5 Ciclo circádico de la serotonina.

En la tabla 13 podemos observar que el máximo en la concentración de serotonina, 5-HTPH y 5-HTP se encuentra a las 24:00 horas del día y el mínimo se encuentra a las 6:00 horas, las concentraciones intermedias a las 18:00 y 12:00 horas, siendo mayor a las 18:00 horas para la 5-HT y el 5-HTPH (ver fig. 18).

La N-acetilserotonina presenta el máximo de concentración a las 12:00 horas y el mínimo a las 24:00 horas del día, permaneciendo constante hasta las 6:00 horas del día siguiente. (ver fig. 18).

5.6 Distribución de la serotonina en el tallo ocular.

Los datos en la tabla 14 muestran que la serotonina se encuentra en mayor cantidad en la médula externa y posteriormente en la médula terminal-nervio óptico, médula interna, retina-

lámina ganglionar y finalmente en la glándula sinusal. Aunque esta última no es estadísticamente confiable, ya que ésta presenta una altura de 9123, que es menor al límite establecido para el sistema. La concentración de la serotonina en el tallo ocular completo realizado a la medianoche es de 0.22 ug/g de tejido húmedo y la sumatoria de las regiones es de 0.1075 ug/g de tejido húmedo, lo cual puede deberse a pérdidas durante la disección en las diferentes regiones anatómicas.

Por otra parte el precursor de la serotonina (5-hidroxitriptofano), se encuentra en mayor cantidad en la retina-lámina ganglionar y en menor cantidad en la médula terminal-nervio óptico, médula interna, médula externa y glándula sinusal indicándonos que la biosíntesis de la serotonina puede llevarse a cabo en esta región.

El 5-hidroxitriptofol un metabolito de la serotonina en vertebrados (ver fig.3), es detectado por primera vez en crustáceos presentando la siguiente distribución: Retina-lámina ganglionar, médula terminal-nervio óptico, médula externa, glándula sinusal y médula interna, detectándose la mayor concentración en la región de la retina-lámina ganglionar (ver fig. 19).

La N-acetilserotonina es un metabolito de la serotonina que se encuentra en mayor cantidad en la retina-lámina ganglionar y posteriormente en la médula externa, médula interna y glándula sinusal (ver fig 19).

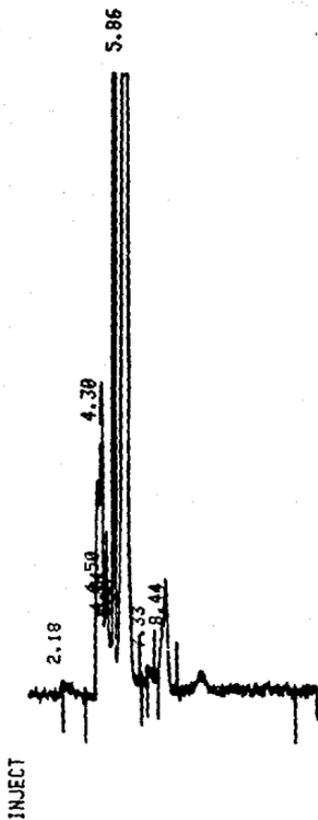


Fig. 17 Cromatograma de la muestra de tallo ocular en el cual se muestra al 5-hidroxitriptofano (5-HTP), $tr = 4.30$; 5-hidroxitriptofol (5HTPH), $tr = 5.86$; N-acetil serotonina (N-acetil 5-HT), $tr = 7.33$; serotonina (5-HT), $tr = 8.44$. La cantidad de serotonina es equivalente a 0.083 ± 0.014 ug/g de tejido humedo con una altura de 61439 ± 10829 .

T A B L A 13
Ciclo circádico

| Hora | Substancia | t.r (min) | Altura (U) | Concentración ($\mu\text{g} / \text{g}$) |
|-------|------------|--------------|---------------|---|
| 6:00 | S-HTP | 4.50 | 169354 | 0.2744 |
| | S-HTPH | 5.86 | 685091 | 1.3846 |
| | N-A-SHT | 7.36 | 9307 | 0.0228 |
| | S-HT | 8.41 | 50817 | 0.0844 |
| 12:00 | S-HTP | 4.61 | 327292 | 0.5190 |
| | S-HTPH | 5.92 | 1334864 | 2.8385 |
| | N-A-SHT | 7.19 | 26044 | 0.0578 |
| | S-HT | 8.38 | 84253 | 0.1285 |
| 18:00 | S-HTP | 4.59 | 260870 | 0.4302 |
| | S-HTPH | 5.95 | 1545773 | 3.0980 |
| | N-A-SHT | 7.31 | 19406 | 0.0315 |
| | S-HT | 8.47 | 102852 | 0.1584 |
| 24:00 | S-HTP | 4.56 | 581633 | 0.9481 |
| | S-HTPH | 5.97 | 1552643 | 3.2153 |
| | N-A-SHT | 7.39 | 8493 | 0.0219 |
| | S-HT | 8.47 | 139191 | 0.2166 |

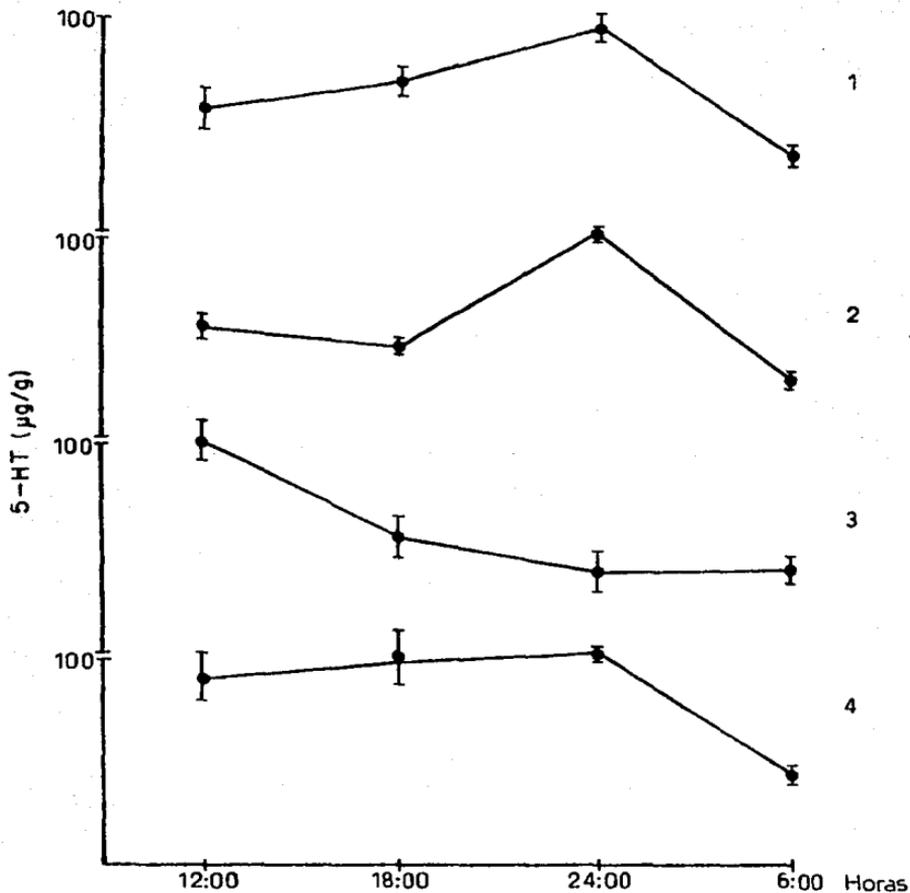


Fig. 18 Ciclo circádico de la serotonina (1), 5-hidroxitriptofano (2), N-acetil serotonina (3) y 5-hidroxitriptofol (4), reportando su máxima concentración como el 100%

T A B L A 14
Fracciones del tallo ocular

| Región | Substancia | t.r (min) | Altura (U) | Concentración (µg/g) |
|-------------------|------------|--------------|---------------|-------------------------|
| G.B | S-HTP | 4.44 | 52530 | 0.0217 |
| | S-HTPH | 5.97 | 269419 | 0.1410 |
| | N-A-S-HT | 7.02 | 8526 | 0.0050 |
| | S-HT | 8.30 | 9123 | 0.0050 |
| R-LB | S-HTP | 4.64 | 1392742 | 1.7444 |
| | S-HTPH | 5.29 | 813697 | 2.8815 |
| | N-A-SHT | 7.11 | 25129 | 0.0100 |
| | S-HT | 8.38 | 16505 | 0.0070 |
| M.E | S-HTP | 4.30 | 83921 | 0.0320 |
| | S-HTPH | 5.80 | 358468 | 0.1726 |
| | N-A-SHT | 7.16 | 15413 | 0.0080 |
| | S-HT | 8.18 | 66408 | 0.0330 |
| M.I | S-HTP | 4.47 | 117088 | 0.0620 |
| | S-HTPH | 6.06 | 188824 | 0.1266 |
| | N-A-SHT | 7.16 | 8057 | 0.0060 |
| | S-HT | 8.38 | 58454 | 0.0308 |
| M.T-N.O | S-HTP | 4.64 | 144153 | 0.0749 |
| | S-HTPH | 5.97 | 347028 | 0.2284 |
| | N-A-SHT | - | - | - |
| | S-HT | 8.44 | 61761 | 0.0321 |
| T.O (completo) | S-HTP | 4.64 | 911449 | 1.9887 |
| | S-HTPH | 6.00 | 1617073 | 3.5500 |
| | N-A-SHT | 7.25 | 22011 | 0.0668 |
| | S-HT | 8.33 | 101689 | 0.2179 |

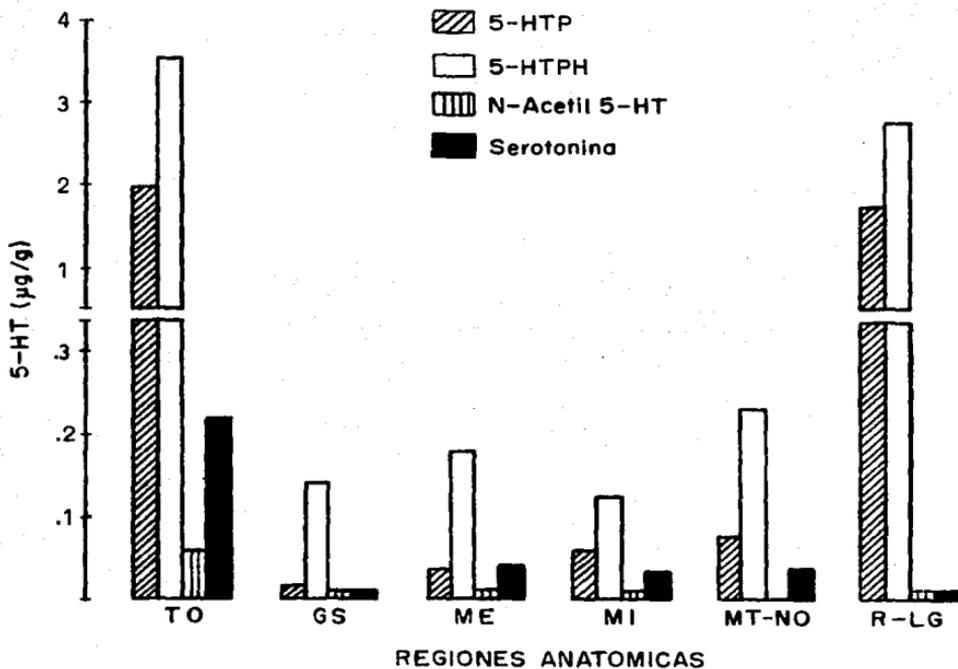


Fig. 19 Concentración de 5-hidroxitriptofano (5-HTP), 5-hidroxitriptofol (5-HTPH), N-acetil serotonina (N-acetil 5-HT) y serotonina (5-HT) en las diferentes regiones anatómicas del tallo ocular. Las fracciones fueron: TO = tallo ocular completo, GS = glándula sinusal, ME = médula externa, MI = médula interna, MT-NO = médula terminal-nervio óptico y R-LG = retina-lámina ganglionar.

VI DISCUSION

El método cromatográfico desarrollado en la presente tesis es específico para la determinación de compuestos 5-hidroxilados, tales como el 5-hidroxitriptofano, 5-hidroxitriptofol, 5-hidroxitriptamina, N-acetilserotonina y melatonina, ya que estos compuestos presentan fluorescencia a 340 nm cuando son activados a 254 nm.

Bowman y cols. (5), afirman que los 5-hidroxiindoles fluorescen a 330 nm cuando son activados a 295 nm a un pH entre 2 y 11. Svendsen y Greibrokk (55), determinan la máxima sensibilidad de indoles cuando son activados a una longitud de onda de 280 nm, teniendo una longitud de onda de emisión de 340 nm, sin embargo ellos confirman la supresión de dicha fluorescencia cuando se modifica la longitud de onda de 340 a 315 nm.

La precisión y exactitud se evaluarón por medio del coeficiente de variación (desviación estándar relativa) y el error estándar que de acuerdo a los criterios tomados como parámetros de comparación, se considera que el sistema es preciso y exacto, ya que ambos valores son menores a los especificados (ver resultados en la tabla 4).

La reproducibilidad se define como: "El grado de variación entre los resultados individuales obtenidos con el mismo método e idéntico material de análisis pero bajo diferentes condiciones (diferente operador, diferente aparato, diferente laboratorio y/o

diferente tiempo)". Los datos mostrados en la tabla 5 (efecto del día), se analizaron por medio del diseño experimental completamente al azar (ANOVA), y comparándolos con los criterios establecidos podemos afirmar con un 95% de confianza y (2,12)gl que la determinación de serotonina se puede realizar en diferentes días por un analista, sin esperar que haya cambio en la cuantificación de dicha amina.

Los datos en la tabla 6 nos muestran los valores obtenidos al evaluar el efecto del analista en la determinación de la serotonina. Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de un diseño experimental completamente al azar (ANOVA) y al compararlos con los criterios establecidos, podemos afirmar con un 95 % de confianza y (2,12)gl que no hay diferencia significativa en la determinación de serotonina realizada en un día por diferentes analistas.

Por tanto afirmamos que el sistema desarrollado es reproducible cuando la determinación se realiza en diferentes días y/o por diferentes analistas.

Se realizó una curva de calibración para evaluar la linealidad del sistema (ver fig 10). Los datos se someten a un análisis de regresión por mínimos cuadrados. La recta de regresión fue:

$$Y = 0.4327 X + (- 0.1862)$$

La pendiente : 0.4327

La ordenada al origen : - 0.1862

La ordenada al origen se somete a prueba de hipótesis para el intercepto, en la cual $t_c = 0.7127$ que es menor al valor obtenido de tablas con un 95% de confianza y $6 \text{ gl } t = 2.45$. Lo anterior nos permite confirmar que el intercepto no es significativamente diferente de cero y que el signo negativo es debido únicamente a la distribución de los puntos y no al comportamiento químico de la serotonina.

El límite de detección para la determinación de serotonina se estimó en la curva de calibración (fig. 10), al trazar las bandas de confianza estimadas con un 95 % de confianza y 6 gl por medio de la desviación estándar por punto (ver anexo II fórmula 19) El límite de detección calculado para este sistema es de 7.5 pmol/5 ul equivalentes a $1.3 \times 10^{-3} \text{ ug /5 ul}$ de serotonina estándar y el límite de decisión es de 15000 unidades del aparato.

La linealidad del método se estimó por análisis de una serie de muestras que cubren el intervalo de concentraciones de 22.2 a 46.89 pmol/5 ul. La línea recta estimada por medio del método de mínimos cuadrados fué :

$$Y = 1.0938 X + (- 18.16)$$

La pendiente : 1.0938

La ordenada al origen : - 18.16

Al realizar la prueba de hipótesis para intercepto se obtiene un valor de $t_c = -2.59$ que es menor a $t = 12.71$ con 1 gl y 95 % de confianza, lo cual es concluyente de que la ordenada al origen no es significativamente diferente de cero según el

criterio de aceptación o rechazo establecido para esta prueba.

Al realizar la prueba de hipótesis para la pendiente se encuentra un valor de $t_c = 9.69$ que es menor a $t = 12.71$ encontrado en tablas con 1 gl y un nivel de confianza del 95%; lo que significa que la pendiente no es significativamente diferente de uno.

El coeficiente de correlación obtenido para la línea recta ajustada por mínimos cuadrados es de 0.99996, el cual nos indica que el 99.99 % de los resultados se deben a la relación entre las variables analizadas y que el 0.01% es debido a errores al azar.

El porcentaje de recuperación de la serotonina en la muestra biológica varió del 84.52 % al 98.63 %, y tuvo un valor promedio de 91.54 % (considerado al reportar la cantidad de serotonina en la muestra biológica), el 8.46 % de serotonina no recuperada pudo deberse a que se unió a proteínas o a que se degradó durante el proceso de extracción. Sin embargo cabe aclarar que todas las determinaciones realizadas se llevaron a cabo sin la presencia de ningún inhibidor enzimático, por lo que es posible que la cantidad de serotonina determinada sea menor a la que realmente hay en el tallo ocular.

El desarrollo del método de extracción fue realizado basado en la evidencia mostrada por otros autores (18,42,51,58,59). El rendimiento de la extracción es del 88.73 % cuando la precolumna se encuentra insertada en el inyector formando parte del sistema cromatográfico.

Los resultados confirman la presencia de la serotonina en el tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii*, encontrando que hay alrededor de 0.09 a 0.1382 $\mu\text{g/g}$ de serotonina.

Welsh y Moorhead (60), cuantificaron este agente en pequeños crustáceos concluyendo que hay alrededor de 0.1 $\mu\text{g/g}$ de serotonina. Fingerman y Fingerman (25), detectan de 7.4 a 7.6 $\mu\text{g/g}$ de serotonina en el acocil *Pacifastacus leniusculus* y Eloffson y cols. (18), determinan 0.1 a 0.15 $\mu\text{g/g}$ de serotonina para la misma especie.

Los resultados obtenidos en la cuantificación son comparables a los encontrados por otros autores, por lo tanto se considera que el método desarrollado es aplicable a la determinación de la serotonina en muestras biológicas.

Encontramos además que la concentración de serotonina esta regida por un ciclo circádico, presentando su máxima concentración a las 24:00 horas y la mínima a las 6:00 horas del día.

Fingerman y Fingerman (26), cuantifican la variación de este agente en el cangrejo *Uca pugilator* durante el transcurso del día, concluyendo que la máxima concentración se encuentra a las 24:00 horas y la mínima a las 18:00 horas del día.

Con los resultados obtenidos se corrobora la existencia del ciclo circádico para la serotonina en crustáceos ya que este se presenta tanto en el cangrejo *Uca pugilator* como en el acocil *Procambarus clarkii*.

Asimismo con el método aquí desarrollado fué posible cuantificar a la serotonina en las diferentes regiones anatómicas del tallo ocular, mostrándose que ésta se encuentra en mayor cantidad en la médula externa, médula terminal-nervio óptico, médula interna, retina-lámina ganglionar y finalmente en la glándula sinusal. Los resultados obtenidos coinciden con las zonas inmunorreactivas descritas por diversos autores (19,52).

Como ya hemos mencionado, el método permitió detectar otros 5-hidroxiindoles encontrando lo siguiente:

- a) El 5-hidroxitriptofano (precursor de la serotonina), se encuentra en mayor cantidad en la retina-lámina ganglionar indicándonos la posible biosíntesis de la serotonina en ésta región, donde es necesaria para su posible intervención en el proceso visual y en menor cantidad en la médula terminal-nervio óptico, médula interna, médula externa y glándula sinusal.
- b) El 5-hidroxitriptofol (metabolito de la serotonina en vertebrados) se dilucida por primera vez en crustáceos encontrándose mayor cantidad de esta en la retina-lámina ganglionar. Lo anterior nos indica que probablemente la serotonina se metabolize rápidamente en ésta región o que la señal observada sea una señal compuesta de una o más sustancias presentes en ésta zona. Para solucionar esta interrogante es necesario proponer otro método de detección que nos permita identificarla ampliamente y/o realizar experimentos con inhibidores enzimáticos de las enzimas que intervengan en la ruta metabólica para su formación.

c) La N-acetilserotonina se encontró en el tallo ocular de la especie en estudio, lo que es muy probable, ya que hay evidencia de la existencia de N-acetiltransferasa en tejidos de invertebrados (12,22,34). Sin embargo la señal cromatográfica debida a la N-acetilserotonina es muy pequeña y para identificarla plenamente es necesario validar el sistema cromatográfico a bajas concentraciones o realizar la identificación por otro sistema de detección y/o realizar experimentos con inhibidores enzimáticos de la enzima N-acetiltransferasa.

Aunque si bien la melatonina se detecta por este método, no se encontró en forma endógena ninguna señal que pudiese identificarla en el tallo ocular de la especie en estudio. Sin embargo Adolph y Tuan (1) detectan no menos de 1 $\mu\text{g/g}$ de melatonina en el ojo lateral de *Limulus* al cuantificarlo por medio de cromatografía en capa fina y derivación con ortoftaldehído. Para verificar la ausencia de melatonina en este sistema biológico podría utilizarse otro método analítico que tuviera mayor sensibilidad a melatonina que el desarrollado en esta tesis.

El presente estudio nos permitió determinar a varios 5-hidroxiindoles en el tallo ocular del acócil *Procambarus clarkii*, cuantificar su ritmicidad circádica y conocer su distribución en las diferentes regiones anatómicas del mismo. Lo anterior fue posible gracias a que el método cromatográfico desarrollado es altamente sensible, reproducible, exacto, preciso y lineal en el intervalo de concentraciones de interés.

VII CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrolla y valida un método para cuantificar a la serotonina en el tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii* por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección de fluorescencia (DF).

Los resultados obtenidos nos permiten concluir lo siguientes:

1. El método cromatográfico es preciso y exacto en el intervalo de concentraciones utilizadas.
2. La reproducibilidad del método es estadísticamente confiable cuando la cuantificación se realiza en diferentes días y/o por diferentes analistas.
3. El sistema es lineal de 5.65 a 70.0 pmol/5 ul.
4. El límite de detección calculado para este sistema es de 7.5 pmol/5 ul equivalentes a 1.3×10^{-3} ug/5 ul de serotonina estándar y el límite de decisión es de 15000 unidades del aparato.
5. El método es lineal en un intervalo de concentraciones de 22.2 a 49.24 pmol/ 5 ul.
6. El porcentaje de recuperación de la serotonina en la muestra biológica al realizar el proceso de extracción fue del 91.54 %, observándose un incremento de ésta cuando aumenta la cantidad de serotonina adicionada a la muestra biológica. Podemos decir entonces que el resto de serotonina no recuperada se este degradando o este unida a proteínas.

7. El sistema cromatográfico desarrollado es aplicable para la cuantificación de serotonina en el tallo ocular completo, en sus diferentes regiones anatómicas y para detectar las variaciones de éste agente durante el transcurso de un ciclo nictameral.
8. La técnica desarrollada permite detectar además de la serotonina, el 5-hidroxitriptofano, 5-hidroxitriptofol, la melatonina y la N-acetilserotonina con una buena resolución entre ellos, aunque no se validó la cuantificación de estos.
9. La melatonina, un metabolito de la serotonina en vertebrados, es detectada cromatográficamente por esta técnica, sin embargo los experimentos realizados nos indican que no hay melatonina endógena en el tallo ocular ó esta se encuentra en bajas concentraciones no detectables por este método.
10. El 5-hidroxitriptofano (precursor de la serotonina), se encuentra en mayor cantidad en la retina-lámina ganglionar indicándonos que la biosíntesis de la serotonina se puede llevar a cabo en esta región, donde puede ser liberada localmente para ser utilizada en el procesamiento de la información visual.
11. La concentración de serotonina en la retina-lámina ganglionar es muy baja en esta zona, lo cual es una evidencia más de la posible liberación local de éste agente a centros de información visual.
12. Es importante enfatizar que el 5-hidroxitriptofol, metabolito de la serotonina en vertebrados, es detectado por primera vez en tejidos de invertebrados por el método cromatográfico

desarrollado en la presente tesis indicando la posible existencia de otra vía metabólica en invertebrados desconocida hasta el momento, sin embargo la verificación de la existencia de este metabolito y consecuentemente de la vía metabólica puede analizarse por medio de otro método analítico o por la utilización de inhibidores enzimáticos implícitos en la ruta metabólica para su formación.

Asimismo la mayor concentración de este metabolito se haya en esta región indicándonos que la serotonina se puede biosintetizar, liberar localmente en los sitios de utilización y metabolizarse rápidamente en el sitio de acción.

13. La N-acetilserotonina, metabolito de la serotonina, se encuentra en mayor cantidad en la médula interna, externa y retina-lámina ganglionar. Lo anterior confirma la existencia de la N-acetilserotonina en tejidos del acocil *Procambarus clarkii* así como en otros tejidos de invertebrados.

14. La serotonina presenta variaciones circádicas a lo largo del ciclo nictameral observándose un máximo a las 24:00 horas y un mínimo a las 12:00 horas del día. Lo anterior corrobora los resultados obtenidos por Fingerman y Fingerman en 1977.

15. Los ciclos diurnos de el 5-hidroxitriptofano, 5-hidroxitriptamina y 5-hidroxitriptofol están en fase mientras que la N-acetilserotonina está defasada.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Adolph, A.R. and Tuan, F.J. Serotonin and Inhibition in *Limulus* Lateral Eye. *The Journal of General Physiology.* (1972) 60: 679 - 697.
- 2 Ahmad, G. and Zamenhof, S. Serotonin as a Growth Factor for Chick Embryo Brain. *Life Sci.* (1978) 22: 963 - 970.
- 3 Amin, A.H., Crawford, T.B.B. and Gaddum, J.H. The Distribution of Substance P and 5-hydroxytryptamine in the Central Nervous System of the Dog. *J.Physiol. Lond.* (1954) 126: 596 - 618.
- 4 Aramant, R. Biogenic Amines in Crustaceans: a Microspectrofluorometric Analysis. *Comp. Biochem. Physiol.* (1980) 66C: 29 - 36.
- 5 Bowman, R.L., Caulfield, P.A. and Udenfriend, S. Spectrophotofluorometric Assay in the Visible and Ultraviolet. *Science.* (1955) 122: 32 - 33.
- 6 Brown, P.R. and Krstulovic, A.M. Practical Aspects of Reversed Phase Liquid Chromatography Applied to Biochemical and Biomedical Research. *Analyt. Biochem.* (1979) 99:1 - 21.
- 7 Clemens, J.A., Roush, M.E. and Fuller, R.W. Evidence that Serotonin Stimulate Secretion of Prolactin Releasing Factor. *Life Sci.* (1978) 22: 2209 - 2214.
- 8 Consolazione, A., Milstein, C., Wright, B. and Cuelllo, A.C. Immunocytochemical Detection of Serotonin with Monoclonal Antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* (1981) 29: 1425 - 1430.
- 9 Cottrell, G.A. and Laverack, M.S. Invertebrate Pharmacology. *A. Rev. Pharmac.* (1968) 8: 273 - 298.
- 10 Currie, A. L. Limits for Qualitative Detection and Quantitative Determination. *Analyt. Chem.* (1968) 40: 586 - 593.
- 11 Curtius, H.Ch., Wolfensberger, M., Steinmann, B., Redweik, V. and Siegfried, J. Mass Fragmentography of Dopamine and 6-hydroxydopamine. Application to the Determination of Dopamine in Human Brain Biopsies from the Caudate Nucleus. *J. of Chromatography.* (1974) 99: 529 - 540.
- 12 Dewhurst, S.A., Croker, G.B., Ikeda, K. and McCaman, R.E. Metabolism of Biogenic Amines in *Drosophila* Nervous Tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* (1972) 43 B: 975 - 981.
- 13 Dudel, J. Facilitatory Effects of 5-hydroxytryptamine on the Crayfish Neuromuscular Junction. *Naunyn-Schmied. Arch.*

- Exp. Phatol. Pharmacol. (1965) 249: 515 - 528.
- 14 Ek., A. and Witkop, B. Synthesis and Biochemistry of 5 - and 7 - Hydroxytryptophan and Derivatives. J. Am. Chem. Soc. (1953) 75: 500 - 501.
 - 15 Elofsson, R., Kauri, T., Nielsen, S.D. and Stromberg, J.O. Localization of Monoaminergic Neurons in the Central Nervous System of *Astacus astacus* linne (crustacea) Z. Zellforsch (1966) 74: 464 - 473.
 - 16 Elofsson, R. Monoamine Containing Neurons in the Optic Ganglia of Crustaceans and Insects. Z. Zellforsch (1972) 133: 475 - 499.
 - 17 Elofsson, R., Nassel, D. and Myhrberg, H. A Catecholaminergic Neuron Connecting the First Two Optic Neuroepiles (lamina ganglionaris and medulla externa) of the Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Cell. Tiss. Res. (1977) 182: 287 - 297.
 - 18 Elofsson, R., Laxmyr, L., Rosengren, E. and Hansson, C. Identification and Quantitative Measurements of Biogenic Amines and Dopa in the Central Nervous System and Haemolymph of the Crayfish *Pacifastacus leniusculus* (crustacea). Comp. Biochem. Physiol. (1982) 71 C: 195 - 201.
 - 19 Elofsson, R. 5-HT-like Immunoreactivity in the Central Nervous System of the Crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Cell. Tiss. Res. (1983) 232: 221 - 236.
 - 20 Erspamer, V. *Experientia* (1946) 2: 369.
 - 21 Erspamer, V. and Asero, B. Identification of Enteramine, the Specific Hormone of the Enterochromaffin cell System as 5-hydroxytryptamine. *Nature, Lond.* (1952) 169: 800 - 801.
 - 22 Evans, P.D. Biogenic Amines in the Insect Nervous System *Adv. Insect. Physiol.* (1980) 15: 317 - 473.
 - 23 Evans, P.H. and Fox, M. P. Enzymatic N-acetylation of Indolealkylamines by Brain Homogenates of the Honey bee, *Apis mellifera*. *J. Insect. Physiol.* (1975) 21: 343 - 353.
 - 24 Falck, B., Hillarp, N.A., Thieme, G. and Torp, A. Fluorescence of Catecholamines and related Compounds with Formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.* (1962) 10: 348 - 354.
 - 25 Fingerman, M., Julian, W.E., Spirtes, M.A. and Kostrzewa, R.M. The Presence of 5-hydroxytryptamine in the eyestalks and Brain of the Fiddler Crab *Uca pugnator*, its quantitative modification by pharmacological agents, and possible role as a Neurotransmitter in Controlling the

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Release of Red Pigment Dispersing Hormone. Comp. Gen. Pharmac. (1974) 1: 341 - 348.

- 26 Fingerman, B.W. and Fingerman, M. Circadian Variations of the Levels of Red Pigment-dispersing Hormone and 5-hydroxytryptamine in the eyestalks of the Fiddler Crab. *Uca pugilator*. Comp. Biochem. Physiol. 56 C: 5 - 8.
- 27 Fischer, L. and Florey, E. Modulation of Synaptic Transmission and Excitation-Contraction Coupling in the Opener Muscle of the Crayfish, *Astacus leptodactylus*, by 5-hydroxytryptamine and Octopamine. *J. Exp. Biol.* (1983) 102: 187 - 198.
- 28 Flamm, R.E. and Harris-Warrick, R.M. Aminergic Modulation in Lobster Stomatogastric Ganglion. I. Effects on Motor Pattern and Activity of Neurons within the Pyloric circuit. *J. Neurophysiol.* 1986a. 55: 847 - 865.
- 29 Florey, E. and Rathmayer, M. The Effects of Octopamine and other Amines on the heart and on neuromuscular transmission in Decapod Crustaceans: Further Evidence for a role as neurohormone. Comp. Biochem. Physiol. (1978) 61 C: 229 - 237.
- 30 Garattini, S. and Valzelli, L. Serotonin Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London 1965.
- 31 Grundfest, H. and Reuben, J.P. Neuromuscular Synaptic Activity in Lobster, In: Nervous inhibition (E. Florey, Ed.). Pergamon Press, Oxford. pp. 92 - 104.
- 32 Harris-Warrick, R.M. and Kravitz, E.A. Cellular Mechanisms for Modulation of Posture by Octopamine and Serotonin in the Lobster. *J. Neuroscience.* (1984) 4:1976 - 1993.
- 33 Harris-Warrick, R.M. and Flamm, E.R. Chemical Modulation of a Small Central Pattern Generator Circuit. *TINS* (1986) : 432 - 437.
- 34 Hayashi, S., Murdock, L.L. and Florey, E. Octopamine Metabolism in Invertebrates (Locusta, *Astacus*, *Helix*): Evidence for N-acetylation in Arthropod Tissues. Comp. Biochem. Physiol. (1977) 58 C: 183 - 191.
- 35 Hubaux, A. and Vos, G. Decision and Detection Limits for Linear Calibration Curves. *Anal. Chem.* (1967) 235: 849 - 855.
- 36 Jordan, D., Poncet, C., Mornex, R. and Ponsin, G. Participation of Serotonin in Thyrotropin Release. *Endocrinology.* (1978) 103: 414 - 419.

- 37 Kennedy M.B. Products of Biogenic Amine Metabolism in Lobsters: Sulfate Conjugates. *J. Neurochem.* (1978) 30: 315 - 320.
- 38 Krstulovic, A.M. Investigations of Catecholamine Metabolism Using High-Performance Liquid Chromatography. *J. of Chromatography.* (1982) 229: 1 - 34.
- 39 Kravitz, E.A., Beltz, B., Glusman, S., Goy, M., Harris - Warrick, R., Johnston, M., Livingstone, M., Schwarz, T. and Siwicki, K. The well-Modulated Lobster. The roles of Serotonin, Octopamine, and Proctoline in the Lobster Nervous System. (Ed.) Plenum Publishing Corp. pp 339 - 360.
- 40 Kravitz, E.A. Hormonal Control of Behavior: Amines and the Biasing of Behavioral Output in Lobsters. *Science* (1988) 241: 1775 - 1781.
- 41 Labhsetwar, A.P. Role of Monoamines in Ovulation: Evidence for a Serotonergic Pathway for Inhibition of Spontaneous Ovulation. *J. Endocr.* (1972) 54: 269 - 275.
- 42 Laxmyr, L. Biogenic Amines and Dopa in the Central Nervous System of Decapod Crustaceans. *Comp. Biochem Physiol.* (1984) 77 C: 139 - 143.
- 43 Livingstone, M.S., Harris-Warrick, R.M. and Kravitz, E.A. Serotonin and Octopamin produce Opposite Postures in Lobsters. *Science.* (1980) 208: 76 - 79.
- 44 Livingstone, M.S., Schaeffer, F.S. and Kravitz E.A. Biochemistry and Ultrastructure of Serotonergic Nerve Endings. *J. Neurobiol.* (1981) 12: 27 - 54.
- 45 Livingstone, M.S. and Tempel, B.L. Genetic Dissection of Monoamine Neurotransmitter Synthesis in *Drosophila*. *Nature.* (1983) 303: 67 - 70.
- 46 Mandel, J. and Linnig, F.J. Study of Accuracy in Chemical Analysis Using Linear Calibration Curves. *Analyt. Chem.* (1957) 29: 743 - 749.
- 47 Martin, L.I. and Ansell, G.B. A Sensitive Gas Chromatographic Procedure for the estimation of Noradrenaline, Dopamine and 5-hydroxytryptamine in Rat Brain. *Biochemical Pharmacology* (1974) 22: 521 - 533.
- 48 Mefford, I.N. and Barchas, J.D. Determination of Tryptophan and Metabolites in Rat Brain and Pineal Tissue by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *J. Chromatography.* (1980) 181: 187 - 193.

- 49 Molnar, I. and Horvath, C. Catecholamines and Related Compounds. Effect of Substituents on Retention in Reversed Phase Chromatography. J. Chromatography (1978) 145: 371 - 381.
- 50 Osborne, N.N. and Neuhoff, V. Formation of Serotonin in Insect (*Periplaneta americana*) Nervous Tissue. Brain Research. (1974) 74: 366 - 369.
- 51 Palmerini, C.A., Cantelmi, M.G., Minelli, A. and Fini, C. Determination of Plasma Serotonin by High-Performance Liquid Chromatography with pre-column sample enrichment and Fluorimetric Detection. J. Chromatography. (1987) 417: 378 - 384.
- 52 Picones, A.M. Modulación Serotoninérgica de la Fotorrepción en el tallo ocular del Crustáceo. Tesis doctoral (1988). Dpto. de Fisiología del CINVESTAV, I.P.N.
- 53 Parsons, M.L. The Definition of Detection Limits. J. Chem. Educ. (1969) 46: 290 - 292.
- 54 Rapport, M.M., Green, A.A. and Page, I.H. Serum Vasoconstrictor (Serotonin): Isolation and Characterization. J. Biol. Chem. (1948) 176: 1243 - 1251.
- 55 Svendsen, H. and Greibrokk, T. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines. II Comparison of Detection Methods. J. Chromatography. (1981) 213: 429 - 437.
- 56 Twardog, B.M. and Page, I.H. Serotonin Content of some Mammalian Tissues and Urine and a Method for its Determination. Am. J. Physiol. (1953) 175: 157 - 161.
- 57 Wallace, B.G. The Biosynthesis of Octopamine-Characterization of Lobster Tyramine -hidroxylase. J. Neurochem. (1976) 26: 761 - 770.
- 58 Wakabayashi, H., Shimada, K. and Aizawa, Y. Determination of Serotonin and Melatonin in Rat Pineal Gland by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet and Fluorometric Dual Detection. Chem. Pharm. Bull. (1985) 33: 3875 - 3880.
- 59 Wakabayashi, H. and Shimada, K. Variation of Melatonin and Serotonin Content in Rat Pineal Gland with Sex and Oestrous Phase Difference Determined by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. J. Chromatography. (1986) 381: 21 - 28.

- 60 Welsh, J.H. and Moorhead, M. The Quantitative Distribution of 5-hydroxytryptamine in the Invertebrates Especially in their Nervous System. *J. Neurochem.* (1960) 6: 146 - 169.
- 61 Zambotti, F., Blau, K., King, G.S., Campbell, S. and Sandler, M. Monoamine Metabolites and Related Compounds in Human Amniotic Fluid Assay by Gas Chromatography and Gas Chromatography and Gas Chromatography-mass Spectrometry. *Clinica Chimica Acta* (1975) 61: 247 - 256.

ANEXO 1

MATERIAL Y EQUIPO

1. El sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución es un equipo modular de cromatografía Waters Millipore (Milford, Mass.), el cual está constituido de los siguientes módulos:

| | |
|-----------------------|---|
| Bomba | Waters Modelo 590 |
| Selector de solventes | Waters SSV (Válvula selectora de solventes). |
| Inyector | Waters U6K, en el cual el asa de la muestra es reemplazada por una precolumna de 30 x 3.9mm d.i. empacada con Corasil C18 con un tamaño de partícula de 37 - 50 micrones. |
| Columna | U Bondapak C18 de 300 x 3.9 mm d.i., con un tamaño de partícula de 10 micras de forma irregular y poro nominal de 125 Å. |
| Detector | Detector de Fluorescencia Modelo 420-AC. |
| Filtros | Excitación = 254 nm Emisión = 338 nm |
| Integrador de datos | Waters Modulo de datos M-730 |

2. Centrifuga refrigerante Sorval Instruments Modelo RC-8.

3. Espectrofluorómetro Aminco Bowman Modelo 14 8960 - E

4. Agitador magnético Mag Mix (GCA / Precisión científica)

5. Potenciometro Cole Parmer 5982-50

6. Filtros

| Filtros | Marca | Tipo | Poro | Proveedor |
|-----------|-----------|------|---------|-----------|
| Agua | HAWP04700 | HA | 0.45 um | Millipore |
| Organicos | FHUP04700 | FH | 0.5 " | " |
| Millex | HSP77663 | - | 0.22 " | " |
| Naylon | 10245 | - | 0.2 " | " |

7. Material de empaque para precolumnas U-Bondapak C18/Corasil de 37 a 50 micrones.

REACTIVOS

Los reactivos citados a continuación se obtienen de Sigma (St. Louis, Mo. U.S.A.):

Heparina de sodio, 5-hidroxitriptamina (serotonina) (5-HT), 3,4-dihidroxi-bencilamina (3,4-DHBA), 3-hidroxitiramina (dopamina), 1-arterenol (noradrenalina) (NA), di-p-hidroxi-feniletanolamina (di-octopamina), 1-tirosina, 1-triptofano 5-hidroxi-1-triptofano (5-HTP), N-acetilserotonina (N acetil 5HT), 6-hidroxi-melatonina, melatonina, 1-dopa y 5-hidroxitriptofol (5-HTPH).

Los solventes utilizados son para cromatografía de líquidos Lichrosolv se obtienen de E. Merck, Darmstadt, y son los siguientes: 2-propanol, metanol, acetonitrilo, acetona.

El ácido perclórico Suprapur, acetato de amonio, ácido acético glacial para análisis y el 2-mercaptoetanol para síntesis también se obtienen de E. Merck, Darmstadt.

El 1-octan sulfonato de sodio se obtiene de Beckman/Altex (Berkeley, CA, U.S.A.).

ANEXO II

FORMULAS EMPLEADAS

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n} \quad (1)$$

$$\sum_{i=1}^n X_i = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n \quad (2)$$

$$\sum_{i=1}^n Y_i = Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots + Y_n \quad (3)$$

$$\bar{Y} = \frac{Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots + Y_n}{n} \quad (4)$$

$$\mu = X \pm t \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (6)$$

$$s_m = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

$$CV = \left(\frac{s}{\bar{X}} \right) \times 100 \quad (8)$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left[\sum_{i=1}^n X_i Y_i \right]^2 / \sum_{i=1}^n X_i^2 \quad (9)$$

$$S_a = S_{xy} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n X_i^2}{n \sum_{i=1}^n x_i^2}} \quad (10)$$

$$S_b = \frac{S_{xy}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2}} \quad (11)$$

$$\left[\begin{aligned} \sum_{i=1}^n x_i^2 &= \sum_{i=1}^n X_i^2 - \frac{\left[\sum_{i=1}^n X_i \right]^2}{n} \\ \sum_{i=1}^n y_i^2 &= \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \frac{\left[\sum_{i=1}^n Y_i \right]^2}{n} \\ \sum_{i=1}^n x_i y_i &= \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \frac{\sum_{i=1}^n X_i \sum_{i=1}^n Y_i}{n} \end{aligned} \right] \quad (12)$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n X_i^2 \sum_{i=1}^n Y_i - \sum_{i=1}^n X_i \sum_{i=1}^n X_i Y_i}{n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left[\sum_{i=1}^n X_i \right]^2} \quad (13)$$

$$m = \frac{n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \sum_{i=1}^n X_i \sum_{i=1}^n Y_i}{\sum_{i=1}^n X_i^2 - \left[\sum_{i=1}^n X_i \right]^2} \quad (14)$$

$$Y = mx + B \quad (15)$$

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i \sum_{i=1}^n Y_i}{\sqrt{\left[\sum_{i=1}^n X_i^2 - \frac{1}{n} \left[\sum_{i=1}^n X_i \right]^2 \right] \left[\sum_{i=1}^n Y_i^2 - \frac{1}{n} \left[\sum_{i=1}^n Y_i \right]^2 \right}}} \quad (16)$$

$$t_c = b_0 - \beta_0 / S_{b_0} \quad (17)$$

$$t_c = m_1 - \beta_1 / S_{b_1} \quad (18)$$

$$S_y = S_{xy} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{n} + (X_0 - \bar{X})^2 / \sum x^2} \quad (19)$$

$$R_s = \frac{2 (t_r)_a - t_r)_b}{w_a + w_b} \quad (20)$$

ANEXO III

TABLA DE ANOVA PARA UN DISEÑO EXPERIMENTAL COMPLETAMENTE ALEATORIO

87

| Fuente de variación. | Suma de cuadrados. | Grados de libertad. | Cuadrados medios. |
|----------------------|--|---------------------|---|
| Entre tratamientos. | $SC_t = \sum_{j=1}^k \frac{T_j^2}{n_j} - \frac{T^2}{N}$ | $t - 1$ | $SC_t / t - 1$ |
| Error experimental. | $SC_e = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n X_{ij}^2 - \sum_{i=1}^n \frac{T_i^2}{n}$ | $N - t$ | $SC_e / N - t$ |
| Total | $T = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n X_{ij}^2 - \frac{T^2}{N}$ | $N - 1$ | RAZON DE VARIANZA " F " $F = \frac{SC_t / t - 1}{SC_e / N - t}$ |

ANEXO IV

ABREVIATURAS USADAS

| | |
|-----------|--|
| TRP | Triptofano |
| 5-HTP | 5-hidroxitriptofano |
| 5-HT | 5-hidroxitriptamina. |
| N-Ac-5-HT | N-acetilserotonina. |
| MEL | Melatonina. |
| 6-OH-MEL | 6-hidroxi melatonina. |
| 5-HIAC | 5-hidroxiacetaldehído. |
| 5-HTPH | 5-h idr oxitriptofol. |
| 5-HIAA | ácido 5-hidroxiindolacético. |
| TH | Triptofano hidroxilasa. |
| DCAA | Descarboxilasa 1 aromática aminoácida. |
| N-AC | N-acetilasa. |
| HIOMT | Hidroxiindol-0-metiltransferasa. |
| MAO | Monoaminooxidasa. |
| AR | Aldehído reductasa. |
| AD | Aldehído deshidrogenasa. |
| ul | Microlitros. |
| pmol | Picomoles. |
| nm | Nanometros. |
| v* | Velocidad de la carta. |
| w* | Ancho del pico. |
| nr* | Nivel de ruido. |
| A* | Area del pico. |

| | |
|------|--|
| tr | Tiempo de retención. |
| Rs | Resolución. |
| U | Unidades del aparato. |
| rpm | Revoluciones por minuto. |
| I.F. | Intensidad de fluorescencia. |
| | Longitud de onda. |
| Xd | Límite de decisión. |
| Yd | Límite de detección. |
| n* | Número de muestras. |
| CV | Coefficiente de variación o desviación estándar relativa. |