



3
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DETERMINACION DE METIONINA-ENCEFALINA Y
LEUCINA-ENCEFALINA POR CROMATOGRAFIA
LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION CON DETECTOR
DE FLUORESCENCIA EN EL CRUSTACEO *Procambarus
clarkii***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

TANIA MARIA ARROYO GONZALEZ RUBIO

FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1980



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 está 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.

R E S U M E N

La Met-enkefalina y la Leu-enkefalina son dos péptidos opioides que juegan un importante papel en los mecanismos del dolor y en la conducta emocional.

Los escasos trabajos que se han realizado para su estudio en crustáceos, han predominado los métodos inmunocitoquímicos, que presentan la desventaja de tener reacciones interferentes, afectando la especificidad.

Es necesario tener una mayor exactitud y precisión, por lo que se desarrolló un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de fluorescencia, utilizando una columna NOVA PAK C 18 (150 x 3.9 mm D.I.).

Se realizó un estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para su detección con fluorescencia, a una longitud de onda de excitación y de emisión de 254 y 338 nm respectivamente para su determinación sin derivar, y de 395 y 450 nm derivadas con fluorescamina.

La fase móvil empleada para su detección sin derivar es: agua:acetonitrilo:tetrahidrofurano (7.6:1.2:1.2) a un flujo de 0.5 ml/min. La cantidad mínima detectada bajo estas condiciones es de 325.916 ng.

La fase móvil para su análisis con derivación precolumna con fluorescamina es: agua:metanol:acetonitrilo (3.0:1.5:2.0) en condiciones isocráticas y un flujo de 0.35 ml/min. La cantidad mínima detectada es de 0.6211 ng.

Esté método puede ser utilizado para la identificación y cuantificación de estos compuestos en el sistema nervioso del crustáceo *Procambarus clarkii*.

INDICE

	Pag.
1 INTRODUCCION	1
1.1 Biosíntesis	3
1.2 Localización y funciones de encefalinas en crustáceos	6
1.3 Métodos de Detección de Péptidos	9
2 OBJETIVOS	15
3 PARTE EXPERIMENTAL	16
3.1 Materiales	16
3.1.1 Reactivos	16
3.1.2 Equipo Cromatográfico	16
3.1.3 Material Biológico	17
3.2 Preparación de la muestra	20
3.2.1 Aislamiento del tallo ocular	20
3.2.2 Método de extracción de las encefalinas	20
3.2.3 Preparación de las soluciones estandar	22
3.3 Condiciones cromatogáficas	22
3.3.1 Elección de la fase estacionaria	23
3.3.2 Elección de los filtros del detector de fluorescencia	24
3.3.3 Elección de la fase móvil	24
3.3.4 Elección del reactivo de derivación	25
3.3.5 Elección de la fase móvil para ensayos con derivación precolumna	27
3.3.6 Elección de las condiciones de inyección del derivado de Met-encefalina y Leu- encefalina con fluorescamina	28
3.3.7 Elección de la velocidad de flujo	28

	Pag.
3.4 Validación del Método	29
3.4.1 Especificidad	29
3.4.2 Precisión del método	29
3.4.3 Exactitud del método	30
3.4.4 Linearidad del Sistema	30
3.4.5 Linearidad del Método	31
3.5 Análisis de muestras biológicas	31
4 <i>RESULTADOS</i>	33
4.1 Elección de los filtros del detector de fluorescencia	33
4.2 Elección de la fase móvil	35
4.3 Elección de la fase móvil para ensayos con derivación precolumna de Met-enkefalina y Leu-enkefalina	38
4.4 Elección de las condiciones de inyección del derivado de Met-enkefalina y Leu-enkefalina con fluorescamina	39
4.5 Elección de la velocidad de flujo	41
4.6 Validación del método	42
4.7 Análisis de muestras biológicas	54
5 <i>ANÁLISIS DE RESULTADOS</i>	57
5.1 Elección de los filtros del detector de fluorescencia	57
5.2 Elección de la fase móvil	58
5.3 Elección de la fase móvil para ensayos con derivación precolumna	60
5.4 Elección de las condiciones de inyección del derivado de Met-enkefalina y Leu-enkefalina con fluorescamina	61

5.5 Elección de la velocidad de flujo	Pag.	63
5.6 Validación del Método		64
5.7 Análisis de muestras biológicas		65
6 CONCLUSIONES		68
7 REFERENCIAS		71
ANEXO I		79
ABREVIATURAS		83

1. INTRODUCCION

Un descubrimiento fundamental en el desarrollo de la Neurobiología fué la identificación de las encefalinas, realizada por J. Hughes y H.W. Kosterlitz en el año de 1975

Se había establecido con anterioridad la existencia de un receptor específico para la morfina (38), en las zonas del sistema nervioso que integran la percepción dolorosa. Por otra parte, la analgesia que se producía como consecuencia de la estimulación eléctrica del tronco cerebral en la rata podía ser parcialmente revertida por el antagonista opiáceo naloxona (2). Siguiendo un razonamiento lógico, el organismo habría de poseer su propio agonista para aquel receptor que respondía a la acción de un alcaloide de origen vegetal. El aislamiento, determinación de la estructura y síntesis de este ligando fueron realizados por J. Hughes y H.W. Kosterlitz (18), utilizando el bioensayo de conducto deferente de ratón, demostraron que una fracción determinada de un extracto procedente de un homegenizado de cerebro porcino, era capaz de bloquear de manera reversible por naloxona las contracciones inducidas por estimulación eléctrica del órgano aislado. Una vez aislado el principio activo de aquella preparación, se puso de manifiesto que, sorprendentemente eran dos las sustancias causantes del efecto inhibitorio, y que, además, su estructura química era de naturaleza peptídica (18):

Tir-Gli-Gli-Fen-Met	Metionina-encefalina
Tir-Gli-Gli-Fen-Leu	Leucina-encefalina

Es de gran interés, el saber que toda la estructura de la Metionina-encefalina está contenida en los residuos 61-65 de la hormona beta-lipotropina (beta-LPH), un polipéptido de 91 aminoácidos, aislada de la glándula pituitaria, por Li en el año de 1964; este hallazgo llevó al descubrimiento de tres grandes péptidos con actividad opióide; todos representados en la secuencia de la beta-LPH: alfa-endorfina (beta-LPH₆₁₋₇₆), beta-endorfina (beta-LPH₆₁₋₉₁) y gamma-endorfina (beta-LPH₆₁₋₇₇) (4,7,14 y 27).

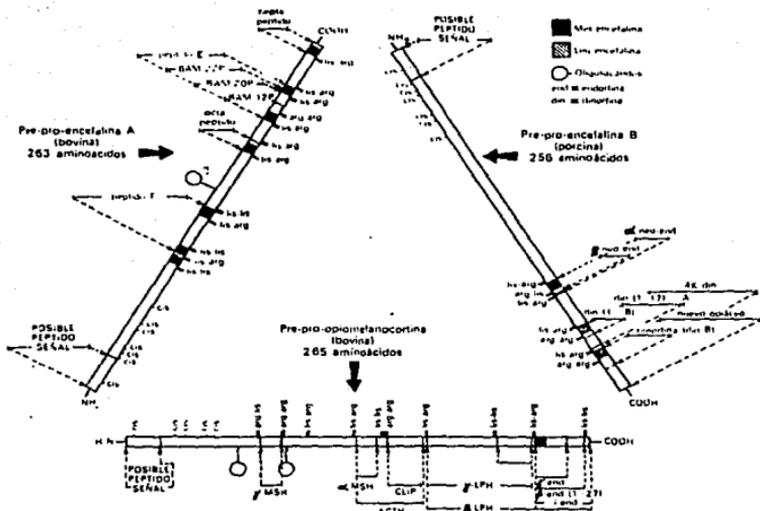
La beta-endorfina, fragmento C-terminal de 31 aminoácidos de la beta-LPH, es el más importante de este grupo de péptidos opioides; la alfa y gamma-endorfina también poseen cierta actividad opiácea pero aún no se sabe si existen como tales en forma natural o si son productos de degradación de la beta-endorfina originados en el proceso de aislamiento y purificación (42).

1.1 Biosíntesis

Se sabe que la mayoría de los péptidos biológicamente activos derivan del procesamiento post-translacional de precursores proteicos de gran tamaño. La fragmentación del precursor implica rotura a nivel de determinados enlaces que vienen determinados por la propia conformación y por la existencia de parajes de aminoácidos básicos (por ejemplo; Lis-Lis, Arg-Lis, etc.) que flanquean ambos lados de la secuencia activa. Enzimas del tipo de la tripsina y otros como la carboxipeptidasa B, fragmentan la molécula por ataque secuenciado, originando péptidos intermedios hasta conseguir aislar la secuencia activa. Así es como se han ido obteniendo péptidos con propiedades opiáceas, de mayor tamaño que la Metionina-encefalina (ME) y la Leucina-encefalina (LE), aunque siempre contienen en su interior una o varias secuencias de estos pentapéptidos; por ejemplo, la beta-endorfina, la dinorfina 1-17, el péptido E, etc.

Se piensa en la actualidad que todos los péptidos opiáceos endógenos aislados hasta ahora pertenecen a una de estas tres familias de péptidos (17): a) la pro-encefalina A, precursora de la Metionina-encefalina, Leucina-encefalina y otros péptidos; b) la pro-encefalina B, precursora tanto de la Leucina-encefalina como de la dinorfina; c) la pro-opiomelanocortina, precursora de la beta-endorfina, ACTH, MSH y otros péptidos. La característica común de los péptidos precursores es la de poseer de manera repetida ciertas secuencias de aminoácidos a lo largo de la estructura: la pro-encefalina A contiene seis copias de ME y una de LE, la pro-encefalina B tiene tres copias de LE, y la pro-opiomelanocortina posee tres secuencias de MSH (fig. 1)

FIGURA Nº 1



Representación esquemática de la pro-encefalina A de buey, pro-encefalina B de cerdo, y pro-opiomelanocortina de buey (17).

Estudios iniciales efectuados por J. Hughes pusieron de manifiesto que las encefalinas derivan de proteínas sintetizadas a nivel de ribosoma (49). Pero conviene aclarar que, a pesar de que la secuencia de ME está incluida en la beta-endorfina, la cual a su vez es parte de la beta-lipotropina, existen datos inmunoquímicos e inmunohistoquímicos que demuestran que las encefalinas y las endorfinas están presentes y son sintetizadas en sistemas neuronales diferentes. Lewis y col. (25) fueron los primeros en demostrar la existencia en el músculo estriado de buey, moléculas proteicas de elevado peso molecular que, tras degradación enzimática, liberan encefalinas. Este resultado fué confirmado en el músculo estriado de cobaya (3), en donde se aislaron cinco proteínas de pesos moleculares de: 95 K, 65 K, 38 K, 22 K y 10 K, mediante cromatografía en gel de poliacrilamida; todas ellas presentan inmunoreactividad a LE. Estos datos indican la existencia de diferentes pasos en la transformación del precursor inicial (95 K) hasta llegar al producto final, las encefalinas.

El sistema de pro-encefalina A ha sido estudiado en las células cromafines de la médula suprarrenal, que lo contiene en gran cantidad, aunque también se encuentra en el sistema nervioso central y en el intestino. La pro-encefalina A puede originar cuatro copias de ME, una de LE y una de las dos Met-encefalina alargadas: el heptapéptido Met-encefalina-Arg⁶-Fen⁷, y el octapéptido Met-encefalina-Arg⁶-Gli⁷-Leu⁸ (fig. 1). Todas ellas tienen actividad opiácea, e incluso el heptapéptido es más activo que la Met-encefalina. Además de la pro-encefalina A, se han aislado varios péptidos intermedios que contienen en su interior una o más secuencias de encefalinas: el péptido F (33 ami-

noácidos) contiene una molécula de ME en el lado N-terminal y otra en el C-terminal; el péptido E (25 aminoácidos) contiene una molécula de ME en su comienzo y otra de LE en su terminación (22). Además, en la suprarrenal de buey se aislaron tres péptidos intermedios (BAM-P), de 12, 20 y 22 aminoácidos, los cuales presentaban una molécula de ME en su comienzo; todos ellos pueden ser considerados fragmentos pertenecientes al péptido E, del cual se desprenden por enzimas no tripsinicos, puesto que se dividen en enlaces que no pertenecen a pares de aminoácidos básicos.

El sistema pro-encefalina B, estudiado en el cerdo principalmente, contiene 256 aminoácidos, y en su estructura se distinguen tres secuencias de Leu-encefalina. Los péptidos intermedios aislados pertenecen a dos series: en la de la alfa-neoendorfina la LE es extendida por su terminal C y en la serie dinorfina, existen varios péptidos intermedios todos ellos sobre la base de extender la LE por su terminal C: la dinorfina 1-8, la dinorfina 1-17 ó dinorfina A y a la rimorfina ó dinorfina B.

1.2 Localización y funciones de encefalinas en crustáceos

Las neuronas secretoras liberan a la circulación sustancias biológicamente activas, generalmente péptidos, por lo cual, suele conocerseles como neuronas peptidérgicas.

El término neurohormona se utiliza conforme a la definición convencional de hormona, un mediador químico único o mensajero, producido por un grupo específico de células, y llevado por vía sanguínea a los órganos blancos (28).

Definiremos a un neurotransmisor como una sustancia que transporta información de una neurona a otra adyacente

por contacto sináptico. La acción de liberación es corta, provocando una respuesta rápida a cambios del medio (28).

Un neuromodulador es considerado como una sustancia liberada de algún tipo de célula que altera la excitabilidad de la neurona y así modula la liberación o acción del neurotransmisor (28).

Las características morfológicas propuestas por Scharrer y Scharrer (46) para considerar a una célula nerviosa como secretora siguen siendo válidas en la mayoría de los casos. Uno de estos criterios es: las células neurosecretoras son amielínicas, no establecen sinapsis con otras células nerviosas u órganos efectores y sus terminales están en contacto íntimo con senos venosos o capilares, formando estructuras especializadas llamadas órganos neurohemales; como la neurohipófisis de los vertebrados, la glándula sinusal de los crustáceos y el corpus cardiacum de los insectos. Estas estructuras son sitios de almacenamiento desde los cuales se liberan a la circulación las sustancias con actividad biológica.

Con el advenimiento de las técnicas inmunocitoquímicas durante la última década, ha sido posible identificar no sólo la naturaleza peptídica de una neurona dada, sino cual es el péptido que contiene. Mediante esta técnica se ha identificado y localizado las encefalinas en el sistema nervioso de invertebrados (5,30 y 41).

Con respecto a los crustáceos Mancillas y col. (29), observaron la presencia de Leu-encefalina inmunoreactiva en tallo ocular de langosta *Panalaris interruptus* en los fotoreceptores primarios de la célula reticular y en las fibras que pasan en dirección centrífuga de la médula terminal, y termina en las fibras de la médula interna. La detección de las encefalinas en la célula reticular sugiere un

posible papel como neurotransmisor para las encefalinas o péptidos estrechamente relacionados, con los fotoreceptores primarios del tallo ocular de langosta.

Posteriormente Fingerman y col. (12) y Jaros y col. (21), en otra especie de crustáceo, localizaron Leu-encefalina y Met-encefalina en las terminales axonales de la glándula sinusal, lo cual puede sugerir que estos péptidos no solamente presentan una función como moduladores de la liberación de productos de neurosecreción de otros axones (neuromoduladores/neurotransmisores) sino que también presentan un papel en la modulación de neurohormonas, o posiblemente, forman parte de la secuencia de alguno de los péptidos neurohormonales liberados del órgano neurohemal.

También se ha encontrado encefalinas inmunoreactivas en células y fibras del órgano-X, en la región donde los axones y ramificaciones de las dendritas de las neuronas neurosecretoras son localizadas en el órgano-X (1 y 20); y en fibras que se encuentran muy cercanas al tracto glándula sinusal-órgano-X dentro de la médula terminal, sugiriendo también que éstas sustancias actúan como neuromoduladores. Otras estructuras semejantes a las encefalinas son encontradas en lámina ganglionar, médula interna, médula externa, en las fibras de las regiones quiasmáticas, y en el pedúnculo óptico (21).

Son muy pocos los trabajos que se han realizado para caracterizar las encefalinas en el sistema nervioso de invertebrados, específicamente en crustáceos para poder elucidar su papel fisiológico de las sustancias que producen inmunoreactividad por lo que es necesario hacer estudios más específicos para su identificación y cuantificación con mayor seguridad; como por ejemplo, la cromatografía líquida de alta resolución, que en la actualidad presenta muchas ventajas: análisis rápidos, sencillos, reproducibles, espe-

cíficos, sensibles y además presenta la posibilidad de la recolección de fracciones con tiempos de retención semejantes a las sustancias sintéticas, para pruebas posteriores para la confirmación de su identidad como son: el bioensayo, la secuencia de aminoácidos, espectrometría de masas, etc.

1.3 Métodos de Detección de Péptidos

El proceso que comunmente se sigue para el estudio de los péptidos biológicamente activos, comprende las siguientes fases (47):

- a) Detección de la actividad biológica en un extracto de tejido.
- b) Cuantificación de dicha actividad.
- c) Constatación de la naturaleza peptidérgica del material observando la desaparición de su actividad mediante el tratamiento de la preparación con pronasa.
- d) Desarrollo de un método físico-químico para el aislamiento del principio activo.
- e) Determinación de la secuencia de aminoácidos.
- f) Síntesis química del péptido y comparación del comportamiento químico y biológico del material nativo y sintético.

Los métodos que se han empleado para la detección y cuantificación de péptidos son: el bioensayo, ensayo de radioreceptores, radioinmunoensayo, inmunocitoquímica y cromatografía líquida de alta resolución.

Los primeros métodos empleados fueron el bioensayo y el ensayo de radioreceptores; siendo el bioensayo la herra-

mienta que se utiliza a lo largo del proceso de purificación para comprobar en que muestras esta localizado el péptido biológicamente activo. Es una técnica simple y de sensibilidad variable, que se emplea con fines cualitativos fundamentalmente. Así por ejemplo, para el caso de las encefalinas se utiliza el ensayo del conducto deferente de ratón; la sensibilidad de este sistema está entre 1-5 ng, y para poder asegurarse de que la sustancia que bloquea la contracción del músculo liso actúa sobre el receptor opiáceo, es necesario comprobar si la inhibición es reversible por naloxona (900 nM) (28).

El ensayo de radioreceptores se basa en la fijación de radioligando específico. Este ensayo está basado en la diferente afinidad de fijación del ligando isotópicamente marcado a una preparación de membranas portadoras del receptor, en presencia y ausencia del mismo ligando no marcado, contenido en la muestra sometida a evaluación cuantitativa. La utilización de la curva de calibración correspondiente, permite obtener la concentración del agonista endógeno en el problema, en función de la cantidad de radioactividad correspondiente al ligando marcado que ha quedado desplazado. Debido a la pequeña concentración del receptor normalmente existente en la preparación biológica, la actividad específica del ligando marcado ha de ser alta y, por tanto, el blanco del ensayo puede presentar valores elevados, disminuyendo a veces de forma notable la sensibilidad de este procedimiento cuando es utilizado para evaluar cuantitativamente un agonista dado (28).

Ambos métodos presentan la desventaja de no distinguir entre las diferentes endorfinas activas, y la presencia de enzimas degradativas o inhibidores de endorfinas en extracto de tejido da resultados inciertos en el ensayo de radioreceptores (47).

El radioinmunoensayo (RIE) es una técnica más sensible; es un ensayo de fijación en el que el receptor es un anticuerpo del péptido activo. El inconveniente del RIE es que el anticuerpo sólo reconoce el determinante antigénico de la molécula del péptido, pudiendo ocurrir que en la muestra existan otras moléculas, a veces de función fisiológica incluso diferente que compartan ese mismo agrupamiento químico correspondiente a un fragmento de la molécula contra el que realmente fue desarrollado el anticuerpo. Por otra parte, debido a que la población de inmunoglobulinas que componen el anticuerpo, es consecuencia del genotipo específico del animal que fué inyectado con el antígeno, la reproducibilidad de resultados entre experimentos realizados con diferentes anticuerpos no tiene por que ser total (28).

Para obtener una respuesta más certera, quizás la forma más correcta sea aislar primero el péptido por cromatografía líquida de alta resolución y, una vez aislado, cuantificar la muestra por RIE (31 y 43).

Finalmente, para el mapeo de la distribución de péptidos opioides, las técnicas inmunohistoquímicas son de gran utilidad. La aplicación de este procedimiento requiere del uso de anticuerpos dirigidos en contra de algún marcador específico del compuesto que se quiere mapear, mediante el cual sea posible identificar la estructura peptidérgica al microscopio óptico o electrónico. El marcador en cuestión es localizado por su anticuerpo en las estructuras que lo contienen, las que a su vez son puestas de manifiesto directamente, si el anticuerpo usado está marcado por alguna sustancia fluorescente o electrodensa, o indirectamente después de haber incubado por segunda vez la misma sección del tejido en un medio que contiene el anti-anticuerpo convenientemente marcado que se fija sobre los anticuerpos antimarcador (37).

Las técnicas inmunocitoquímicas tienen a su favor la elevada especificidad del anticuerpo y por consiguiente la limpieza del marcaje. Las dificultades para su empleo radican en la frecuente inexistencia de un marcador suficientemente antigénico y las dificultades inherentes a su purificación, la presencia de reacciones cruzadas entre el anticuerpo antimarcador y otras macromoléculas no relacionadas con el componente bajo estudio, y la poca sensibilidad de la técnica, por dificultades en la penetración del anticuerpo a las estructuras que contienen el marcador (37).

La localización detallada de la distribución de encefalinas (11, 45, 54 y 57) es llevada a cabo usando la técnica de RIE e inmunocitoquímica.

La Cromatografía Líquida es otro método que se ha empleado en la actualidad para la identificación y cuantificación de péptidos. La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos que pueden ser desde simples iones inorgánicos hasta complejas macromoléculas. Los componentes de la muestra se distribuyen en dos fases; una de las cuales permanece estacionaria, mientras que la fase móvil se desplaza a través de los intersticios sobre la superficie de la fase estacionaria. El desplazamiento de la fase móvil es uno de los factores de migración que diferencia los componentes de la muestra, además de la temperatura de la columna, y la cantidad de fase estacionaria (23 y 48).

Durante muchos años se ha practicado la cromatografía líquida en una forma que llamaremos clásica y que consiste básicamente en lo siguiente. En una columna de vidrio, cuyo diámetro varía de 2 a 10 cm, relleno de algún material

(como sílica, alumina, etc.) cuyas partículas son por lo general de un tamaño cercano a las 200 micras, se suspende la muestra en un disolvente y se introduce en la columna, posteriormente se agrega la fase móvil, con la cual se eluye la muestra a través de la columna. La cantidad de la muestra varía entre 0.1-1.0 g ó más. El disolvente o fase móvil fluye a través de la columna por efecto de la gravedad, produciéndose apenas una débil presión ejercida por el volumen de la fase móvil que se agrega a la columna. El disolvente se recolecta en la base de la columna en fracciones de determinado volumen. Uno de los inconvenientes de esta técnica es el prolongado tiempo de análisis requerido, otra desventaja es que el material de relleno se utiliza por lo general, una sola vez debido a que parte de la muestra usualmente se absorbe en forma irreversible (15,48).

El problema principal de esta cromatografía líquida clásica es la identificación y cuantificación de los componentes que eluyen de la columna disueltos en la fase móvil. En general se usa alguna técnica auxiliar como por ejemplo; espectrometría, análisis químico volumétrico, etc.

En la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) se emplea un instrumental muy diferente al usado en cromatografía líquida clásica, la cual hace que dicho método sea uno de los que ofrece más ventajas en la actualidad, como son: deterioro lento de la columna a pesar de su uso continuo, buena resolución y reproducibilidad, cortos tiempos de análisis y gran sensibilidad (15).

En este método se emplean columnas de diámetro muy reducido, relleno de materiales especiales cuyas partículas tienen un tamaño de 30 a 40 micras. Este tipo de columna es muy eficaz, pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 400 atm.) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna.

La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña por lo que se requiere que la muestra también sea pequeña entre 1 y 10 microgramos (15).

En la CLAR, una pequeña muestra a separar se inyecta a la corriente de la fase móvil que va por la columna que contiene la fase estacionaria y es capaz de ir retardando gradualmente el flujo de cada uno de los componentes de manera individual, saliendo de la columna a intervalos de tiempo discretos.

Un detector colocado a la salida de la columna proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale, lo que permite obtener un cromatograma que se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de la muestra.

En la CLAR existen dos tipos de sistemas de elución: sistema isocrático y sistema de gradiente. En el primero se requiere que se mezclen el disolvente en la proporción adecuada manteniéndose constante la composición de la fase móvil a lo largo del análisis. En el segundo sistema la composición de la fase móvil varía con respecto al tiempo de análisis (39, 48).

Esta técnica se ha empleado para estudios in vitro de encefalinas y endorfinas; así como estudio de metabolismo y síntesis, utilizando diferentes detectores; el más usado rutinariamente es el de UV (6,8 y 21), pero también se han empleado el de fluorescencia (36 y 56) y electroquímico (35).

2. O B J E T I V O S

Desarrollar un nuevo método para la determinación de dos péptidos opioides endógenos; la Metionina-encefalina y la Leucina-encefalina en el crustáceo *Procambanus clankii*, por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) con detector de fluorescencia.

Objetivos Específicos:

Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la identificación y cuantificación de encefalinas por CLAR con detector de fluorescencia.

Validar estadísticamente la técnica analítica con la finalidad de conocer su confiabilidad.

Detectar la presencia de encefalinas en el tallo ocular del crustáceo *Procambanus clankii*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos

Los estándares Met-encefalina y Leu-encefalina fueron de los producidos por Península*. El acetonitrilo, metanol, acetona grado cromatográfico y el éter etílico, ácido clorhídrico, 2-mercaptoetanol grado analítico se obtuvieron de Merck*. El ácido trifluoroacético de Pierce*, el ácido acético ultrex de Baker* y la fluorescamina de Sigma*. Las sales de fosfato y boratos, así como la Amberlita XAD-2 se obtuvieron de Merck*.

El agua empleada en la preparación de los reactivos y la fase móvil es tridestilada, desionizada, y pasada a través de un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore*).

3.1.2 Equipo Cromatográfico

Las determinaciones cromatográficas se hicieron en un equipo modular Waters Millipore* que consta de:

- Bomba de doble pistón, modelo 590
- Válvula de selección de solventes
- Inyector U6K
- Detector de fluorescencia, modelo 420
- Integrador de datos, modelo M-730

* Marcas registradas de laboratorios productores.

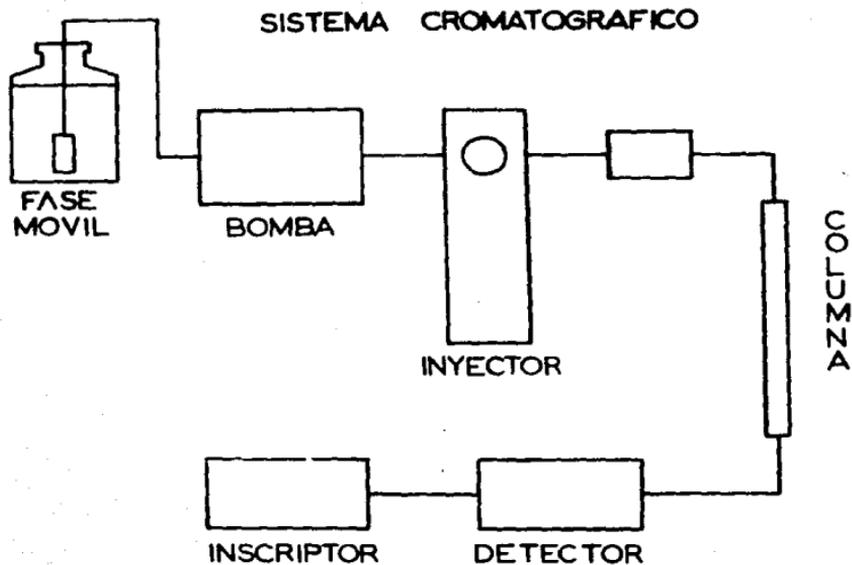
La columna de separación que se empleó fué de fase reversa NOVA PAK C 18 (150 x 3.9 mm D.I.) con tamaño de partícula de 3 µm de diámetro de sílica gel y un tamaño de poro nominal de 125 Å.

La fig. 2 muestra un esquema del sistema cromatográfico que consiste en un recipiente cerrado que contiene la fase móvil, ésta es llevada hacia el inyector a través de una bomba de doble pistón. En el inyector se depositan las muestras y estas son acarreadas a la columna donde ocurre la separación. En el detector se determina la fluorescencia relativa de los productos; el detector tiene un lámpara que emite entre 200 y 800 nm con el pico máximo en el UV, los productos ya derivados con fluorescamina absorben a 390 nm y emiten a 450 nm, la señal de emisión es amplificada por un fotomultiplicador alimentado con alto voltaje y posteriormente digitalizado por un convertidor analógico/digital. Finalmente las señales son graficadas en un integrador.

3.1.3 Material Biológico

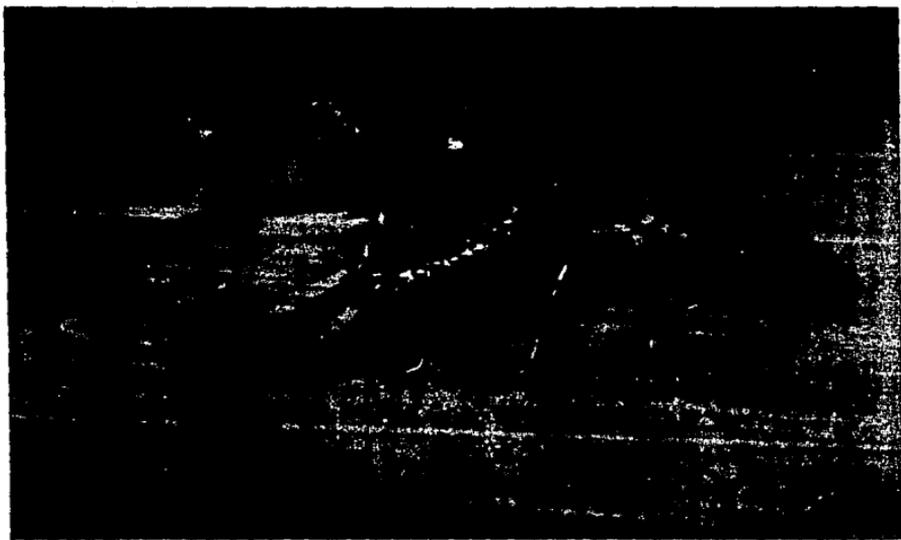
Las muestras biológicas se obtuvieron de tallos oculares aislados de acociles *Procambarus clarkii* (fig. 3) provenientes del Estado de Chihuahua, se utilizaron especímenes adultos y solo aquellos que no se encontraban en época de muda. Los animales fueron mantenidos en estanques con agua corriente a temperatura ambiente y con ciclos naturales de luz-obscuridad.

FIGURA Nº 2



Esquema del Sistema Cromatográfico

FIGURA Nº 3



Crustáceo *Procambanus clarkii*

3.2 PREPARACION DE LA MUESTRA

3.2.1 Aislamiento del tallo ocular

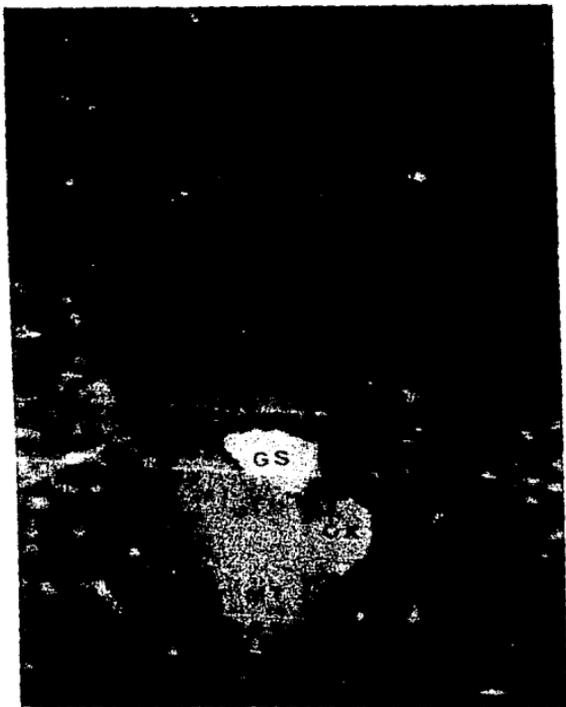
El procedimiento empleado para el aislamiento del tallo ocular es: se corta el rostrum del acocil con tijeras de punta fina hacia la ablación del pedúnculo ocular, que era mantenido durante la disección en solución fisiológica para crustáceos (Van Harreveld, 1936), a una temperatura de 10°C aproximadamente. En seguida se fracturaba el exoesqueleto bajo observación microscópica haciendo 3 ó 4 cortes en forma radial a la quitina y luego separando con pinzas de punta fina cada uno de los segmentos. En estas condiciones el tallo ocular muestra un recubrimiento de tejido muscular, cuyas fibras se insertan por un extremo en la quitina y por otro a una capa de tejido conectivo que cubre la estructura nerviosa, está última era extirpada cuidadosamente, lo que permitía exponer el tallo ocular.

La fig. 4 muestra la disposición de la estructura nerviosa que forman el tallo ocular. Los componentes ópticos incluye: a la retina (R), la lámina ganglionar (LG), la médula externa (ME), la médula interna (MI) y la médula terminal (MT). El tallo ocular también esta formado por un complejo neurosecretor; la glándula sinusal (GS) y el órgano X (OX).

3.2.2 Método de extracción de las encefalinas

Al tejido se le preservó el contenido de encefalinas inactivando las enzimas proteolíticas mediante el calentamiento durante 3 min. en el horno de microondas (13).

FIGURA Nº 4



Estructura Nerviosa del tallo ocular de acocil

Se añadió 1 ml de solución de acetonitrilo: agua:ácido acético: 2-mercaptoetanol (2:1:0.025:0.025 v/v), se homogeneizó y se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min. a 4°C.

El sobrenadante se liofilizó, se resuspendió en HCl 0.1 N, se le adicionó 3 ml de resina Amberlita XAD-2 y se agitó durante 15 min.

Se lavó posteriormente la Amberlita XAD-2: dos veces con 20 ml de HCl 0.1 N y dos veces con 20 ml de agua.

Finalmente las encefalinas se recuperaron añadiendo 5 ml de metanol a la resina Amberlita XAD-2, se agitó por 5 min. y se liofilizó el metanol (44).

3.2.3 Preparación de Las soluciones estandar

La solución patrón se preparó disolviendo 0.5 mg de Met-encefalina o Leu-encefalina en 3 ml de la solución de extracción (acetonitrilo: agua: ácido acético: trifluoroacético (2:1:0.025:0.025 v/v), la concentración de esta solución es de 131.16 ng/ μ l.

La solución de trabajo se preparó por una dilución de la solución patrón con la misma solución anterior a una concentración final de 4.2312 ng/ μ l

3.3 CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

Para la determinación de los pentapéptidos Met-encefalina y Leu-encefalina en muestras biológicas es necesario elegir las condiciones cromatográficas adecuadas para obtener una buena separación y sensibilidad. —

3.3.1 Elección de la fase estacionaria

Inicialmente se tuvo que elegir la fase estacionaria que pudiera efectuar la separación de Met-encefalina y Leu-encefalina. Las columnas utilizadas para la separación de estos compuestos son (16):

Ciano

Fenil o difenil

C 18

Las columnas ciano son de naturaleza polar y son utilizadas principalmente para la elución de péptidos hidrofóbicos de gran tamaño con alta recuperación, pero este tipo de columna no es recomendable para péptidos en un intervalo de 5-14 residuos de aminoácidos (55).

Las columnas difenil y fenil son también útiles para la separación de péptidos, pero son menos selectivas que las columnas C 18 porque se basa en las interacciones con aminoácidos aromáticos (55).

Las columnas C 18 es la de mayor hidrofobicidad, selectividad, es más resistente a los solventes orgánicos y ácidos débiles por lo que tiene un tiempo de vida de uso mayor, además de que la mayoría de los péptidos pueden ser separados por este tipo de columnas modificando solamente la concentración del disolvente orgánico en la fase móvil, siendo por lo tanto la más recomendada por la bibliografía para el análisis de estos compuestos (16).

Por lo anteriormente mencionado y por ser la disponible en el laboratorio se eligió una columna NOVA PAK C 18 (150 x 3.9 mm D.I.).

3.3.2 Elección de Los filtros del detector de fluorescencia

El detector con el que cuenta el sistema cromatográfico es el de fluorescencia, que contiene filtros intercambiables de longitud de onda de 254, 338, 395 y 450 nm.

Para elegir los filtros se realizó un espectro de excitación y de emisión de las encefalinas en un espectrofluorómetro a una sensibilidad de 100 y una abertura del monocromador de 0.5

Se tomó 50 μ l de la solución patrón de concentración de 131.16 ng/ μ l, se adicionó 1.5 ml de la solución de extracción y se corrieron los espectros de emisión y de excitación como se muestra en la fig. 5.

3.3.3 Elección de la fase móvil

Para elegir la fase móvil se basó principalmente en la resolución y sensibilidad, probando 3 fases en condiciones isocráticas:

- a) agua/2-propanol
- b) solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 3.0/ acetoneitrilo.
- c) agua/acetoneitrilo:tetrahidrofurano (1:1)

Observando en la primera bajo condiciones isocráticas que no existe una resolución adecuada.

Para la segunda fase se eligió el 27.5 % en solución amortiguadora de fosfatos (19), y en la tercera fase del 24 % de acetoneitrilo:tetrahidrofurano (1:1) en agua, encontrando una buena resolución en ambas. Se eligió esta última por ser la que presenta una mayor sensibilidad o altura del pico, para la misma concentración como se muestra en la fig. 6

Se realizó una curva de calibración, tomando: 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 μ l de una mezcla de Met-enkefalina y Leu-enkefalina (1:1) de solución estandar patrón de una concentración de 131.16 ng/ μ l para ser inyectados al cromatógrafo, los resultados se muestran en la gráfica 1.

Los límites de detección bajo estas condiciones es de 327.9166 ng/5 μ l, lo que implicaría un uso elevado de material biológico debido a las pequeñas concentraciones existentes de encefalinas en el tallo ocular.

De los resultados anteriores surge la necesidad de utilizar un método que incrementara la fluorescencia de estos compuestos.

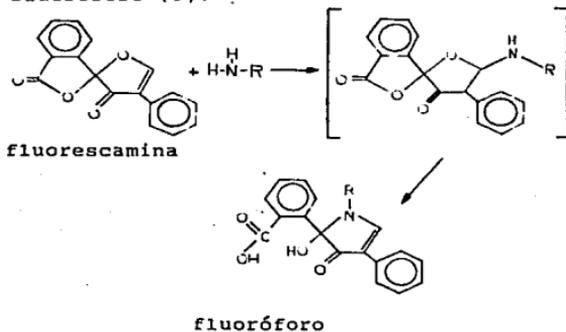
3.3.4 Elección del reactivo de derivación

Los reactivos que pueden ser usados para la derivación precolumna son: la fluorescamina y el orto-ftalaldehído, ambos reaccionan con aminas primarias dando productos fluorescentes. La longitud de onda de excitación y de emisión máxima es de 390 nm y 475 nm para la fluorescamina y 340 nm y 450 nm para el orto-ftalaldehído (16).

Hay algunas diferencias significativas entre los dos reactivos: la fluorescamina es insoluble en agua y es preparado en disolventes no hidroxílicos, generalmente la acetona o el dioxano. Cuando esta solución es mezclada con una solución acuosa a pH alcalino que contiene aminas primarias forma un producto fluorescente cuantitativamente. El exceso de fluorescamina es hidrolizado dando productos solubles en agua no fluorescentes (9).

El orto-ftalaldehído es soluble en agua y puede disolverse en solución amortiguadora para la reacción. La cual requiere 2-mercaptoetanol y orto-ftalaldehído para formar el producto fluorescente con aminas primarias. Como con la fluorescamina se necesita un pH alcalino. La desventaja de este reactivo es que el producto no es tan estable como el formado con la fluorescamina (33); y el producto formado con amoníaco es de la misma intensidad que los formados con aminas primarias. Otro problema con el orto-ftalaldehído es la susceptibilidad a oxidarse con el aire (16).

De estos reactivos se eligió la fluorescamina que ha dado muy buenos resultados para la determinación de encefalinas (56), reaccionando de la siguiente manera para la formación del fluoróforo (9):



donde R = Tir-Gli-Gli-Fen-Met
Tir-Gli-Gli-Fen-Leu

Se realizó un espectro de emisión y de excitación de las encefalinas para comprobar la longitud de onda de excitación y de emisión del compuesto reportado en la bibliografía (9).

Se tomaron 50 μ l de la solución patrón de encefalinas, se le adicionó 450 μ l de la solución de extracción, 50 μ l de solución amortiguadora de boratos 0.05 M pH 9.7, 500 μ l de fluorescamina al 0.02 % en acetona y se obtienen los espectros como mostrados en la fig. 7. Encontrando bajo estas condiciones una longitud de onda máxima de excitación de 395 nm y de emisión de 453 nm aproximadamente en el espectrofluorómetro a una sensibilidad de 100 y abertura del monocromador de 0.5.

3.3.5 Elección de la fase móvil para ensayos con derivación precolumna

Para la elección de la composición de la fase móvil que nos permitiera una buena separación de Met-encefalina y Leu-encefalina derivados con fluorescamina se realizaron variaciones en las proporciones de metanol, acetonitrilo y agua, hasta encontrar una fase que nos diera una buena resolución.

La reacción de derivación se realizó como sigue: 50 μ l de Met-encefalina, más 50 μ l de Leu-encefalina, más 100 μ l de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.4, más 100 μ l de fluorescamina al 0.02 % en acetona (56). Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 1.

3.3.6 Elección de las condiciones de inyección del derivado de Met-enkefalina y Leu-enkefalina con fluorescamina

Para elegir las condiciones de inyección de los derivados de encefalinas se realizó un estudio en el espectrofluorómetro para determinar a que pH (7.4, 8.3, 9.7 y 10.4) se presenta una mayor intensidad de fluorescencia, con dos soluciones amortiguadoras: de fosfatos 0.05 M y boratos 0.05 M a pH 9.7. Se encontró que la solución de boratos 0.05 M a pH 9.7 presenta una mayor respuesta.

Posteriormente para elegir el tiempo de reacción de las encefalinas con la fluorescamina más adecuados donde se presentará una mayor sensibilidad; a 50 μ l de cada una de las encefalinas se le adicionó 10 μ l de solución amortiguadora, más 100 μ l de fluorescamina 0.02 % y se inyectó 5 μ l al cromatógrafo cada 5 min.

Lo anterior se realizó con solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.4, que de acuerdo a K.M. Wu y col. es el pH donde se presenta una mayor respuesta y con solución amortiguadora de boratos 0.05 M pH 9.7. Los resultados obtenidos son observados en la gráfica 2 y 3.

3.3.7 Elección de la velocidad de flujo

Se realizó tomando 50 μ l de cada una de las encefalinas de la solución estandar de trabajo, se adicionó 10 μ l de solución amortiguadora de boratos 0.05 M pH 9.7, más 100 μ l de fluorescamina al 0.02 % en acetona, se deja reaccionar por 40 min. Se hicieron inyecciones de 5 μ l de la mezcla de los derivados de encefalinas, variando la velocidad de flujo de 0.2 hasta 0.5 ml/min. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 4.

3.4 VALIDACION DEL METODO

Una vez desarrollado el método analítico es necesario la validación de la técnica por medio de la especificidad, precisión, exactitud y linealidad.

3.4.1 Especificidad

Esta prueba se realizó con los siguientes péptidos: factor liberador de tirotrópina, tirosina, D-Ala-Met-encefalina, (Des-Tir)-Met-encefalina, fomorfanida, sustancia P, oxitocina, somastostatina, angiotensina, y beta-endorfina; para confirmar que la medición se debe únicamente a la Met-encefalina y la Leu-encefalina, y no a otras sustancias que puedan estar presentes en la muestra.

Se tomó 50 μ l del péptido, se le adicionó 5 μ l de solución amortiguadora de boratos 0.05 M pH 9.7 y 50 μ l de fluorescamina al 0.02 % en acetona, se dejó reaccionar por 40 min. y se inyectó 5 μ l al cromatógrafo.

En la tabla 2 se muestra el tiempo de retención de cada uno de los péptidos probados, observándose que estos no interfieren en el análisis de las encefalinas.

3.4.2 Precisión del Método

Se realizó tomando 50 μ l de cada una de las encefalinas de la solución estandar de trabajo, se adicionó 10 μ l de solución amortiguadora de boratos 0.05 M pH 9.7, más 100 μ l de fluorescamina 0.02 % en acetona, dejando reaccionar durante 40 min. y posteriormente se inyectó 5 μ l. La reacción anterior se preparó cada 5 min. y se realizaron inyecciones consecutivas cada 5 min.

Esta prueba se efectuó durante dos días y con dos operadores diferentes, los resultados se muestran en las tablas 3, 4, 5 y 6.

3.4.3 Exactitud del Método

Es una medida de la concordancia promedio entre un valor experimental y un valor de referencia. Esta prueba se realizó haciendo 6 determinaciones con tres concentraciones diferentes de Met-encefalina y Leu-encefalina (1.26792, 1.90182, y 2.53486 ng/5 μ l) realizando una dilución de la solución estandar patrón y efectuando la reacción de derivación como anteriormente se mencionó. Los resultados se muestran en la tabla 7 y 8.

3.4.4 Linealidad del Sistema

De la solución patrón se tomó 50 μ l de encefalinas, se le adicionó 500 μ l de solución de extracción, y de esta solución se tomó: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 20.0 y 25.0 μ l de cada una de las encefalinas y se aforó a 100 μ l con la solución de extracción, y se efectuó la reacción de derivación como se mencionó anteriormente.

Las gráficas 5 y 6 muestran una curva de calibración típica de Met-encefalina y Leu-encefalina respectivamente, realizadas con este procedimiento. Se observa que la altura del pico de las encefalinas sigue una relación lineal en función de la concentración. A estos datos se les realizó una regresión lineal y por interpolación se calculó el contenido de Met-encefalina y Leu-encefalina en la muestra.

El límite de detección es aproximadamente de 0.6211ng/5 μ l para las encefalinas, siendo esta concentración la mínima a inyectarse para obtener la altura del pico dos veces mayor a la señal de ruido.

3.4.5 Linealidad del Método

De la solución patrón se tomó 50 μ l de encefalina, se le adicionó 500 μ l de solución de extracción y de esta se tomaron: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 y 20.0 μ l de cada una de las encefalinas, y se procedió a efectuar el método de extracción como se menciona en la sección 3.2.2 y posteriormente la reacción de derivación con fluoescamina.

En la gráfica 7 y 8 se observa que el porcentaje adicionado y el porcentaje recuperado siguen una relación lineal.

3.5 ANALISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras biológicas de 20 acociles liofilizadas se resuspendieron en 10 μ l de solución de extracción, se adicionó 1 μ l de solución amortiguadora de boratos 0.05 M pH 9.7 y 10 μ l de fluoescamina 0.02 %, se dejó reaccionar por 40 min. y se inyectó 5 μ l al cromatógrafo.

La identificación de Met-encefalina y Leu-encefalina se realizó por tiempos de retención que son de 10.054 \pm 0.0879 y 12.529 \pm 0.0895 respectivamente para las muestras biológicas (fig. 8).

A fin de confirmar la identidad de las sustancias presentes en el tallo ocular, se adicionó Met-encefalina y Leu-encefalina puras a la muestra biológica, y se encontró que se sumaban las señales con idénticos tiempos de retención, como se observa en la fig. 9

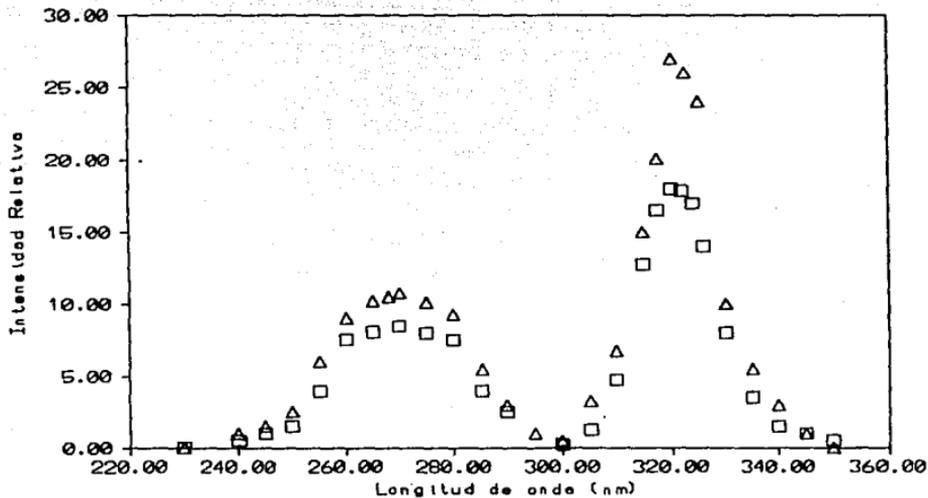
Se realizaron 3 muestras biológicas de 40 tallos oculares cada una, en dos días diferentes, obteniéndose las concentraciones por tallo ocular de Met-encefalina y Leu-encefalina por interpolación en la curva de calibración correspondiente. Los resultados se muestran en la tabla 13.

La muestra Nº 5 se inyectó 3 veces, 5 μ l al cromatógrafo y se encontró un intervalo de confianza para muestras biológicas de Met-encefalina de 0.76808 ± 0.075811 ng/tallo ocular y para la Leu-encefalina de 0.37765 ± 0.016307 ng/tallo ocular.

4. RESULTADOS

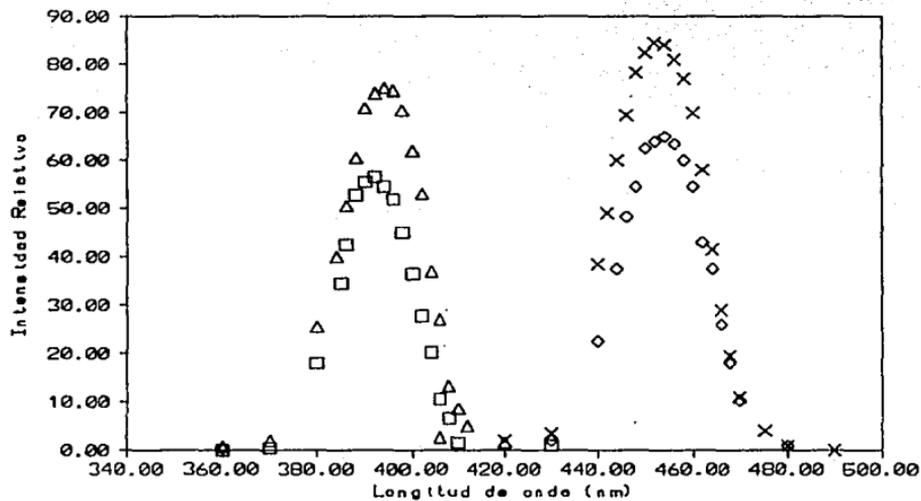
4.1 Elección de los filtros del detector de fluorescencia

FIGURA Nº 5



Espectro de excitación y de emisión de Met-enkefalina y Leu-enkefalina con fluorescencia nativa

FIGURA Nº 7



Espectro de excitación y de emisión de los derivados de Met-enkefalina y Leu-enkefalina con fluorescamina

CURVA DE CALIBRACION DE
MET-ENCEFALINA Y LEU-ENCEFALINA

Concentración (ng/μl)	Met-encefalina Altura	Leu-encefalina Altura
327.916	132.27	167.77
491.875	199.64	254.12
655.833	265.24	339.35
819.792	330.52	419.80
983.749	397.22	505.59

La ecuación de la recta es:

$$\text{Met-encefalina } Y = 0.4030 X + 0.6660$$

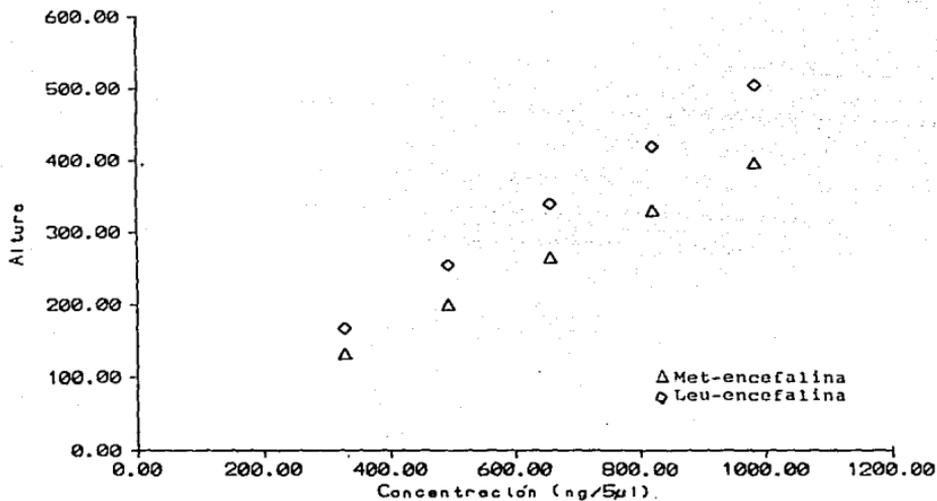
$$\text{Leu-encefalina } Y = 0.5131 X + 0.7981$$

de donde: Y = Valor de la altura reportado por el integrador.

X = Concentración (ng/μl)

GRAFICA N° 1

CURVA DE CALIBRACION DE
MET-ENCEFALINA Y LEU-ENCEFALINA



4.3 Elección de la fase móvil para ensayos con derivación precolumna de Met-enkefalina y Leu-enkefalina.

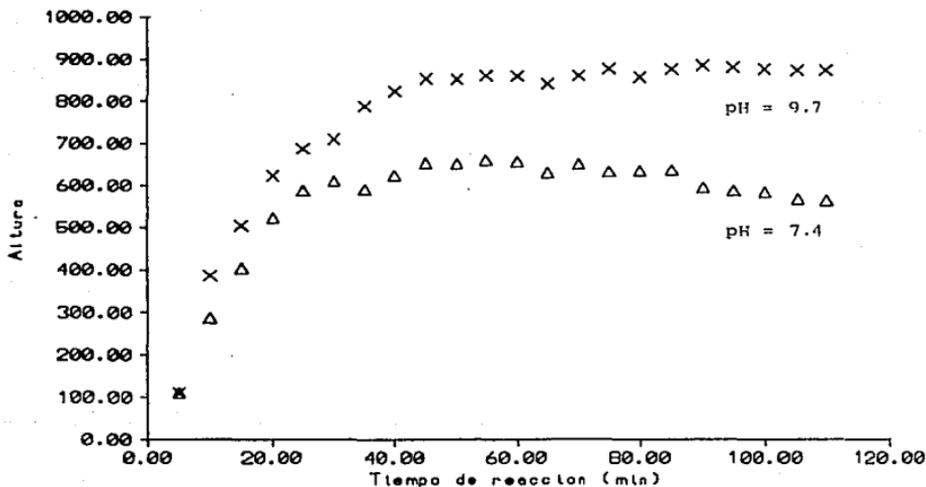
TABLA Nº 1

FASE MOVIL	AGUA (ml)	METANOL (ml)	ACETONITRILO (ml)	RESOLUCION
1	200	200	200	0.12
2	250	200	200	0.36
3	300	200	200	0.62
4	350	200	200	1.16
5	300	200	150	1.73
6	300	150	200	1.85
7	350	150	200	2.62

4.4 Elección de las condiciones de inyección del derivado de Met-enkefalina y Leu-enkefalina con fluorescamina

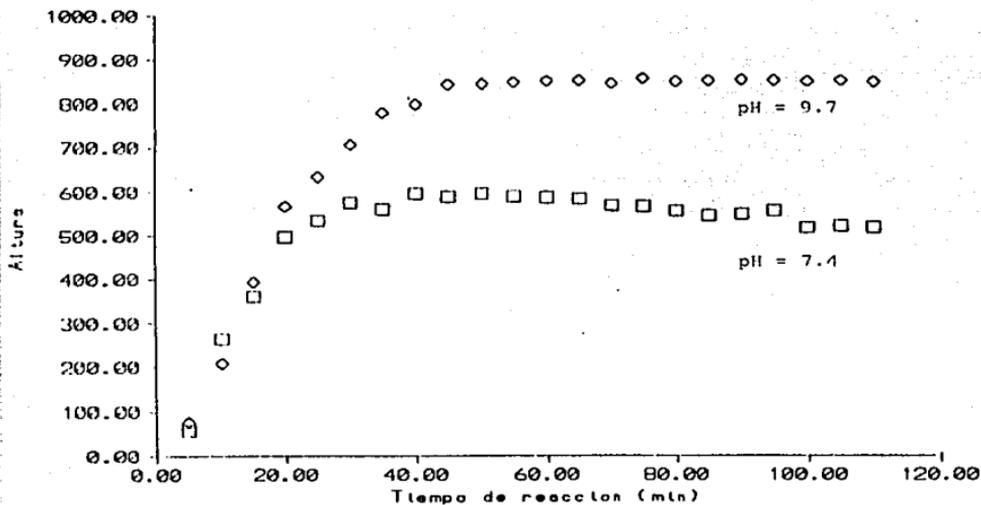
GRAFICA Nº 2

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REACCION DE MET-ENCEFALINA DERIVADA CON FLUORESCAMINA A pH 7.4 y 9.7 SOBRE LA ALTURA DEL PICO



GRAFICA No. 3

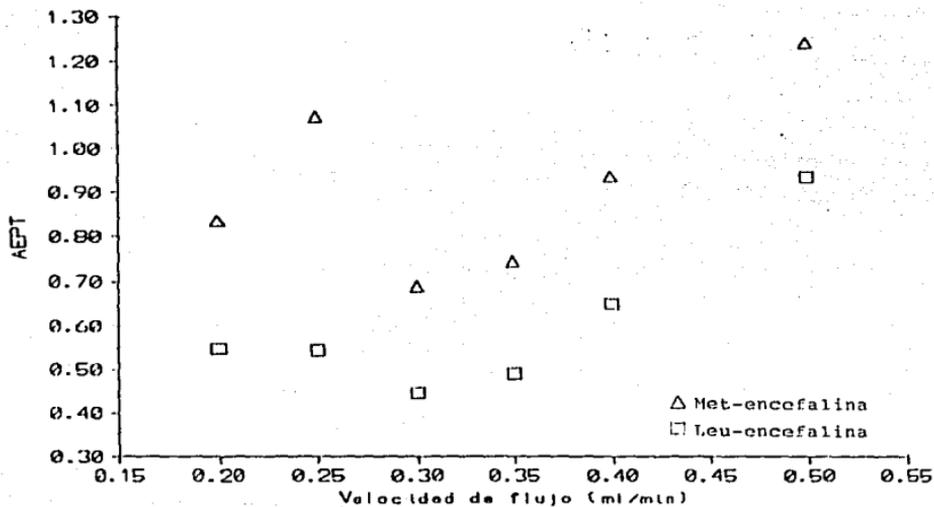
INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REACCTON DE LEU-ENCEFALINA DERIVADO
CON FLUORESCAMINA A pH 7.4 y 9.7 SOBRE LA ALTURA DEL PICO



4.5 Elección de la velocidad de flujo

GRAFICA No. 4

ALTURA EQUIVALENTE DE PLATOS TEORICOS EN FUNCION
DE LA VELOCIDAD DE FLUJO



4.6 Validación del Método

Para la validación del método se realizaron las pruebas de: especificidad, precisión, exactitud y linealidad.

Especificidad

Los resultados de esta determinación se muestran en la tabla Nº 2.

Los tiempos de retención de los péptidos analizados son diferentes a los tiempos de retención de la Met-enkefalina y Leu-enkefalina, y por lo tanto no interfieren en su elución.

Precisión y Exactitud del Método

En las tablas 3 y 4 se muestran los resultados de precisión del método en dos días diferentes y con dos analistas y en las tablas 5 y 6 la diferencia entre analistas de Met-enkefalina y Leu-enkefalina.

En las tablas 7 y 8 se observan los resultados de exactitud del método con una concentración de 1.2685, 1.9028 y 2.5371 ng/5 µl.

Linealidad del Sistema y del Método

Los resultados de linealidad del sistema y del método para la Met-enkefalina se muestran en las tablas 9 y 11, y en las gráficas 5 y 7 correspondiente; y para Leu-enkefalina en las tablas 10 y 12, y en las gráficas 6 y 8.

TABLA No. 2

ESPECIFICIDAD DEL METODO

PEPTIDO	REACCION CON FLUORESCAMINA	TIEMPO DE RETENCION
Factor liberador de tirotopina	+	5.79 ± 0.04
Tirosina	+	6.54 ± 0.06
D-Ala-Met-encefalina	+	6.91 ± 0.03
(Des-Tir)-Met-encefalina	+	8.08 ± 0.02
Met-encefalina	+	10.25 ± 0.07
Leu-encefalina	+	12.83 ± 0.04
Fomorfamida	+	21.87 ± 0.13
Sustancia P	-	----
Oxitocina	-	----
Somastostatina	-	----
Angiotensina	-	----
Beta-endorfina	-	----

TABLA No. 3

PRECISION DEL METODO ENTRE DIAS DE
METIONINA-ENCEFALINA

		ANALISTA A % Recuperado		ANALISTA B % Recuperado	
		DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2
		98.15	98.43	101.71	100.79
		101.28	100.17	98.86	101.25
		100.73	101.16	99.61	99.51
		101.43	101.84	99.43	100.18
		98.52	100.30	101.05	98.66
		99.59	98.76	100.26	99.03
		100.06	101.81	99.15	99.50
		100.41	100.26	100.26	98.84
		97.79	98.98	100.06	99.85
		102.04	99.87	99.60	100.15
X		99.998	100.158	99.999	99.776
S		1.459	1.202	0.870	0.839
S ²		1.916	1.300	0.682	0.633
C.V.		1.459 %	1.200 %	0.871 %	0.841 %
ICS		101.042	101.018	100.623	100.376
ICI		98.954	99.298	99.376	99.176

TABLA No. 4

PRECISION DEL METODO ENTRE DIAS DE
LEUCINA-ENCEFALINA

	ANALISTA A		ANALISTA B	
	% Recuperado		% Recuperado	
	DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2
	99.94	99.77	101.35	100.10
	100.29	101.37	99.55	99.47
	100.32	98.86	99.71	99.51
	98.47	101.76	99.57	100.27
	100.54	98.98	100.19	99.33
	100.16	101.14	100.40	100.11
	100.46	98.79	100.11	100.85
	98.45	100.61	100.96	99.11
	100.10	100.38	101.65	99.69
	100.25	101.90	99.88	99.98
X	99.838	100.356	100.337	99.842
S	0.808	1.201	0.747	0.519
S ²	0.587	1.299	0.503	0.243
C.V.	0.809 %	1.197 %	0.748 %	0.520 %
ICS	100.416	101.415	100.876	100.213
ICI	99.260	99.496	99.803	99.471

TABLA No. 5

PRECISION DEL METODO ENTRE ANALISTAS DE
METIONINA-ENCEFALINA

	ANALISTA A	ANALISTA B
X	100.0780 %	99.8875 %
S	1.3036	0.8400
S ²	1.6145	0.6704
C.V.	1.3026 %	0.8409 %
ICS	100.6881 %	100.2806 %
ICI	99.4679 %	99.4944 %
N	20	20

TABLA No. 6

PRECISION DEL METODO ENTRE ANALISTAS DE
LEUCINA-ENCEFALINA

	ANALISTA A	ANALISTA B
X	100.0970 %	100.0895 %
S	1.0313	0.6758
S ²	1.0104	0.4338
C.V.	1.0303 %	0.6752 %
ICS	100.5797 %	100.4058 %
ICI	99.6143 %	99.7732 %
N	20	20

TABLA No. 7

EXACTITUD DEL METODO DE
METIONINA-ENCEFALINA

Conc. adicionada (ng/5 μ l)	Conc. recuperada (ng/5 μ l)	% Recuperado
1.2685	1.26792	99.95
1.2685	1.26790	100.04
1.2685	1.27591	100.58
1.2685	1.26197	99.48
1.2685	1.26141	101.80
1.2685	1.27509	100.51
		X 100.3930
		S 0.7978
		C.V. 0.7947 %
1.9028	1.90182	99.94
1.9028	1.90197	100.36
1.9028	1.89584	99.63
1.9028	1.93211	101.54
1.9028	1.88296	98.96
1.9028	1.89930	99.82
		X 100.0420
		S 0.8655
		C.V. 0.8651 %
2.5371	2.53486	99.91
2.5371	2.53615	99.96
2.5371	2.51427	99.10
2.5371	2.54580	100.34
2.5371	2.57059	101.32
2.5371	2.50399	98.69
		X 99.8860
		S 0.9291
		C.V. 0.9302 %

TABLA No. 8
EXACTITUD DEL METODO DE
LEUCINA-ENCEFALINA

Conc. adicionada (ng/5 μ l)	Conc. recuperada (ng/5 μ l)	% Recuperado
1.2685	1.26800	99.96
1.2685	1,26787	99.95
1.2685	1.28753	101.50
1.2685	1.27555	100.55
1.2685	1.27745	100.70
1.2685	1.27052	100.16
		X 100.4700
		S 0.5911
		C.V. 0.5883 %
1.9028	1.90493	100.11
1.9028	1.90185	90.95
1.9028	1.92138	100.97
1.9028	1.90850	100.30
1.9028	1.88232	98.92
1.9028	1.92180	100.99
		X 100.2066
		S 0.7662
		C.V. 0.7647 %
2.5371	2.53589	99.95
2.5371	2.53493	99.91
2.5371	2.53473	99.90
2.5371	2.54580	100.34
2.5371	2.51122	98.98
2.5371	2.54911	100.47
		X 99.9250
		S 0.5223
		C.V. 0.5227 %

TABLA N° 9

LINEARIDAD DEL SISTEMA DE
METIONINA-ENCEFALINA

Concentración (ng/5 µl)	Altura
0.6211	39.5100
1.2685	82.3333
1.9028	124.1846
2.5371	163.4445
3.8056	249.5207
5.0741	328.4720
6.3427	410.0675

La recta de regresión es:

$$Y = 64.7788 X + 0.2036$$

GRAFICA N° 5

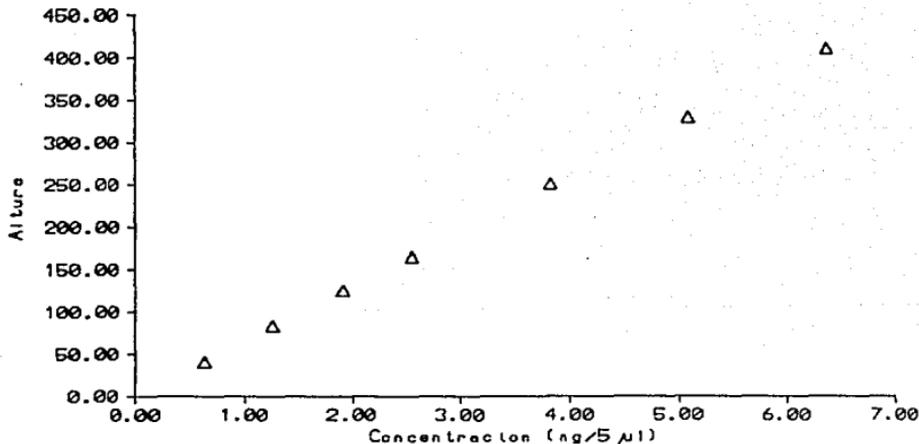


TABLA N° 10

LINEARIDAD DEL SISTEMA DE
LEUCINA-ENCEFALINA

Concentración (ng/5 µl)	Altura
0.6211	40.2560
1.2685	82.7186
1.9028	123.3962
2.5371	161.3820
3.8056	246.5220
5.0741	323.9290
6.3427	411.3020

La recta de regresión es:

$$Y = 64.4844 X - 0.0365$$

GRAFICA N° 6

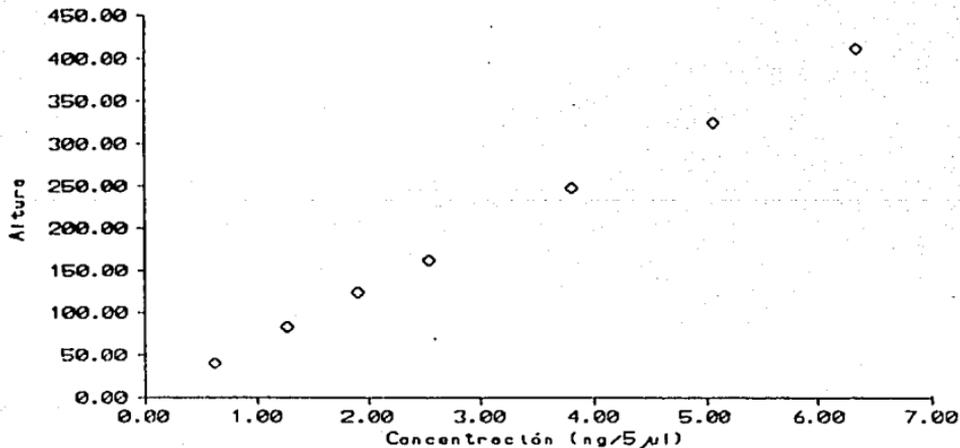
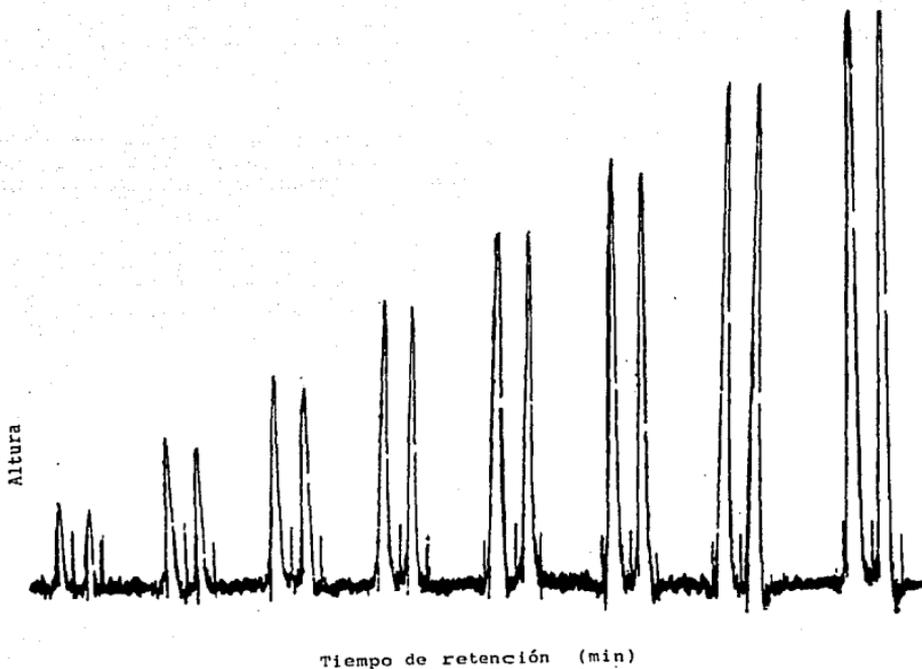


FIGURA N° 7



Chromatograma de la Curva de Calibración de
los derivados de Met-enkefalina y Leu-enkefalina
con fluorescamina

TABLA Nº 11

LINEARIDAD DEL METODO DE
METIONINA-ENCEFALINA

Conc. adicionada (ng/5 µl)	Conc. recuperada (ng/5 µl)	% Adicionado	% Recuperado
0.6211	0.6140	24.48	25.12
1.2685	1.2510	49.99	49.31
1.9028	1.8799	74.99	74.10
2.5371	2.4935	100.00	98.28
3.8057	3.7493	150.00	147.78
5.0741	5.0077	199.99	197.38

La recta de regresión es:

$$Y = 0.9860 X + 0.0043$$

GRAFICA Nº 7

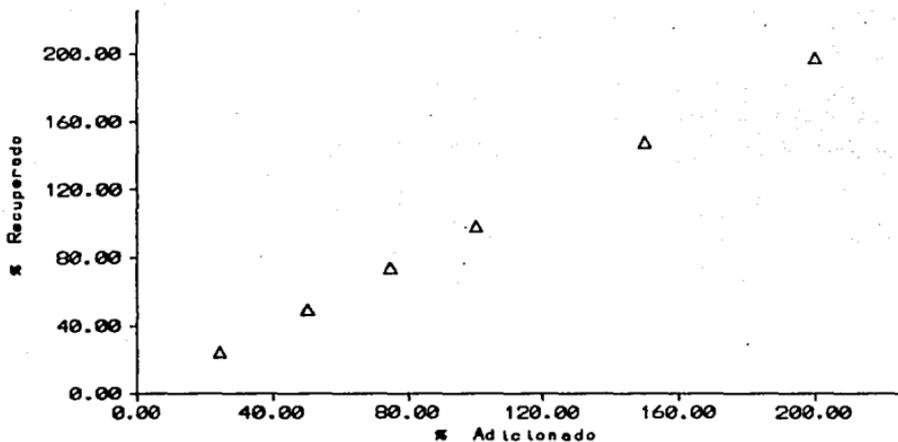


TABLA N° 12

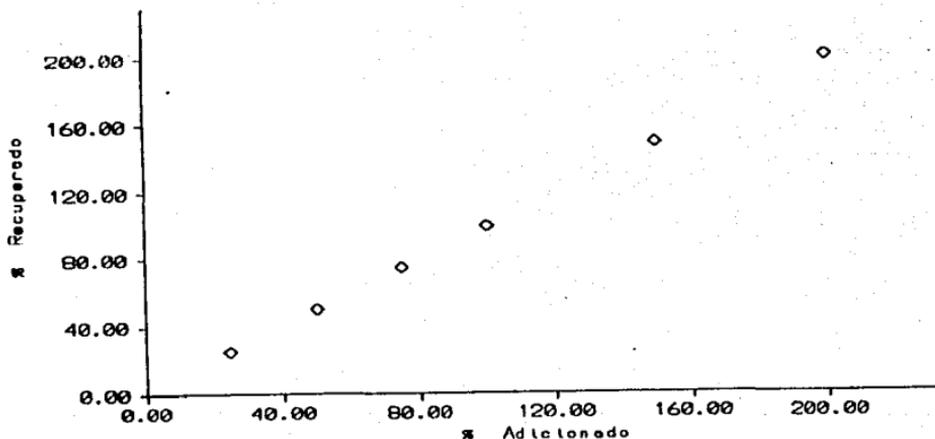
LINEARIDAD DEL METODO DE
LEUCINA-ENCEFALINA

Conc. adicionada (ng/5 µl)	Conc. recuperada (ng/5 µl)	% Adicionado	% Recuperado
0.6211	0.6388	24.48	25.18
1.2685	1.2769	49.99	50.33
1.9028	1.9043	74.99	75.06
2.5371	2.5335	100.00	99.86
3.8057	3.8028	150.00	149.89
5.0741	5.1188	199.99	201.76

La recta de regresión es:

$$Y = 1.0047 X - 0.0306$$

GRAFICA N° 8



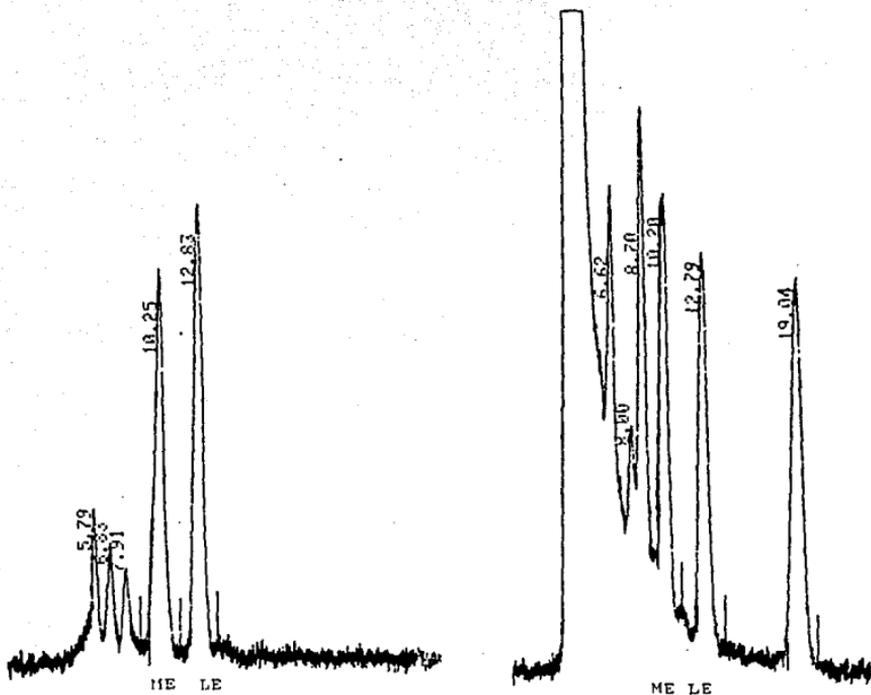
4.7 Análisis de Muestras Biológicas

TABLA Nº 13

CONCENTRACION DE MET-ENCEFALINA Y LEU-ENCEFALINA
EN MUESTRAS DE TALLO OCULAR DE ACOCIL *Procambarus clarkii*

Nº de Muestra	Met-encefalina (ng/tallo)	Leu-encefalina (ng/tallo)
1	0.6703	0.9493
2	0.4387	0.4609
3	0.9946	0.6755
4	1.2736	0.2838
5	0.7718	0.3738
6	0.8907	0.7624

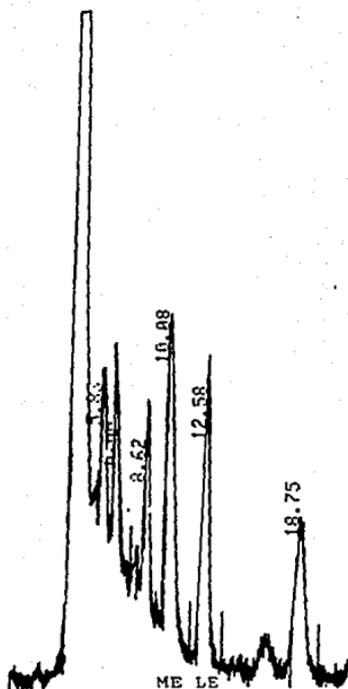
FIGURA N° 8



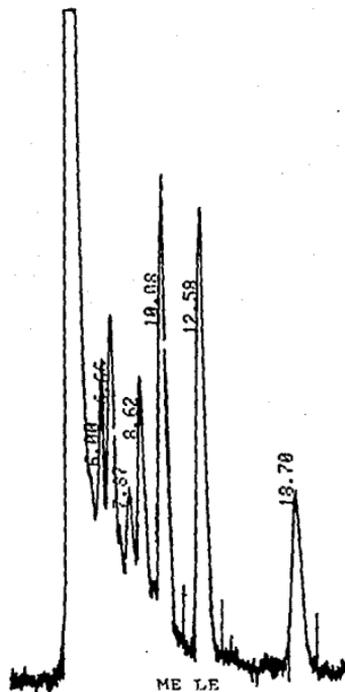
A) Solución estándar de los derivados de Met-enkefalina y Leu-enkefalina con fluorescamina

B) Muestra de tallo ocular derivada con fluorescamina

FIGURA No 9



A) Muestra de tallo ocular derivada con fluorescamina



B) Muestra de tallo ocular con adición de Met-enkefalina y Leu-enkefalina puras derivada con fluorescamina

5. ANALISIS DE RESULTADOS

Se desarrolló un método por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase reversa con detección de fluorescencia, para la cuantificación simultánea de Met-enkefalina y Leu-enkefalina en el sistema nervioso de acocil *Procambanus clankii*.

El trabajo experimental consistió en el estudio de las condiciones cromatográficas y la validación del método para la cuantificación de estos péptidos.

5.1 Elección de los filtros del detector de fluorescencia

El proceso de fluorescencia puede ser descrito como sigue: Una molécula absorbe un fotón de cierta longitud de onda y es excitado a niveles más altos de energía. Una porción de esta energía es perdida (generalmente como calor) y la otra porción de energía absorbido decae al nivel de energía inicial, con la emisión de un nuevo fotón, esto ocurre en un tiempo de vida de nanosegundos. La longitud de onda de emisión es siempre mayor (de baja energía) que la longitud de onda de excitación (13).

Se deben elegir adecuadamente los filtros del detector con la longitud de onda de excitación y emisión máxima de los compuestos fluorescentes para que el fluorómetro sea más selectivo y sensible. Por lo anterior se escogieron los filtros de excitación y de emisión respectivamente de: 254 y 338 nm para el análisis de las encefalinas con fluorescencia nativa, y de 395 y 450 nm para las encefalinas derivadas con fluorescamina; por ser los filtros disponibles en el laboratorio que más se aproximan a la máxima longitud de onda obtenido en los espectros (fig. 5 y 7).

5.2 Elección de la fase móvil

La fase móvil en cromatografía líquida de alta resolución juega un importante papel en los procesos de separación. Esta influye en los tiempos de retención del soluto sobre la columna y por lo tanto en la separación de los compuestos y la selectividad (16).

En CLAR de fase reversa la fase móvil generalmente está constituida de agua o una solución amortiguadora con uno ó dos disolventes orgánicos, los más utilizados en el análisis de péptidos son: el acetonitrilo, metanol, 2-propanol y tetrahidrofurano (16); la proporción de estos depende de la polaridad del compuesto.

La máxima separación óptima de dos compuestos por unidad de tiempo, está dado por el factor de capacidad (k') que se obtiene por la variación de la composición de los disolventes en la fase móvil. Los disolventes se eligen en base a su polaridad, que es la fuerza con que se llevan a cabo las interacciones intermoleculares del soluto con el disolvente, y se encuentra representada por la serie eluotrópica. En CLAR de fase reversa valores de k' pequeños implican una resolución deficiente, y por lo tanto es necesario utilizar otro con mayor polaridad o cambiar la composición de la mezcla de disolventes para ajustar la polaridad (23).

SERIE ELUOTROPICA DE LOS DISOLVENTES MAS UTILIZADOS
EN LA DETERMINACION DE PEPTIDOS

DISOLVENTE	POLARIDAD	CONSTANTE DIELECTRICA
Agua	10.2	80.0
Acetonitrilo	5.8	37.5
Metanol	5.1	32.7
2-propanol	4.0	20.3
Tetrahidrofurano	4.0	7.6

Para elegir la fase móvil que nos permitiera una buena resolución y sensibilidad se hicieron pruebas por ensayo y error. Las fases móviles que proporcionaron mejores resultados son:

- a) Agua/2-propanol
- b) Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 3.0/
acetónitrilo
- c) Agua/acetónitrilo:tetrahidrofurano (1:1)

En la primera fase móvil aunque no se observa una resolución de la Met-encefalina y la Leu-encefalina bajo condiciones isocráticas, cuando se emplea un gradiente lineal de 2-propanol (6.5 % al 50.79 %), si es factible la separación, presentando algunas desventajas bajo estas condiciones: pobre reproducibilidad, tiempos de análisis muy largos, coleo de los picos.

La segunda fase móvil se eligió en base a los resultados de K.S. Hui y col. (19) para la separación de las encefalinas y sus metabolitos, y la tercera fase móvil por pruebas de ensayo y error. Ambas nos proporcionan muy buena resolución bajo condiciones isocráticas; presentando mejor sensibilidad la fase móvil constituida por el 76 % de agua y 24 % de acetónitrilo:tetrahidrofurano (1:1).

Estas fases móviles aunque no son de utilidad para la cuantificación de Met-enkefalina y Leu-enkefalina en el sistema nervioso de acocil por CLAR con detector de fluorescencia, tienen la ventaja de que pueden servir para la realización de otras pruebas posteriores para la confirmación de su identidad, mediante la recolección de fracciones de las muestras biológicas con tiempos de retención semejantes a los estándares. Estas pruebas pueden ser: el bioensayo en el conducto deferente aislado de ratón, determinación de la secuencia de aminoácidos, radioinmunoensayo, etc.

5.3 *Elección de la fase móvil para ensayos con derivación precolumna*

Como se mencionó anteriormente la finalidad de elegir una fase móvil apropiada es la de encontrar una separación adecuada de las enkefalinas para su identificación y cuantificación.

Para saber que tan buena es la separación se cuenta con un parámetro denominado resolución (R_s). Un valor de R_s igual a uno indica una buena resolución, valores mayores de uno indican separaciones excelentes, y valores menores de uno representan separaciones deficientes.

En base ha este criterio y a los resultados obtenidos mostrados en la tabla N° 1, se eligió la fase móvil constituida por: agua: metanol: acetonitrilo (3.0:1.5:2.0 v/v), por que presentó una excelente separación de Met-enkefalina y Leu-enkefalina.

También se observa que un incremento de metanol o acetonitrilo provoca que las encefalinas eluyan más rápido y la separación sea deficiente; y un incremento de la proporción de agua, una mayor retención de estos compuestos y una mejor separación, como la fase móvil constituida por: agua: metanol: acetonitrilo (3.5: 1.5: 2.0), pero presenta la desventaja de que el tiempo de análisis y el ensanchamiento del pico es mayor.

Se adicionó 0.1 % de ácido trifluoroacético por que produce una disminución de la interacción de los compuestos con la columna de fase reversa C 18, esto es debido principalmente a la eliminación de la absorción de los compuestos a la matriz de la columna. Por lo tanto, al ácido trifluoroacético es útil en CLAR para la separación de péptidos opioides, porque disminuye los tiempos de elución sin disminuir la resolución, además de mejorar la sensibilidad y la forma del pico eliminando el coleo (10).

5.4 Elección de las condiciones de inyección del derivado de Met-enkefalina y Leu-enkefalina con fluorescamina

Compuestos con grupo funcional nucleófilo (aminas primarias y secundarias, alcoholes, agua, etc.) son capaces de reaccionar con la fluorescamina; pero solamente las aminas primarias dan productos fluorescentes (13).

La reacción es rápida, la amina primaria se adiciona a la doble ligadura de la fluorescamina y posteriormente se transforma en un arreglo multipaso al fluoróforo.

Los principales factores que influyen en la reacción de las encefalinas con la fluorescamina son: el pH y el tiempo de reacción.

Se realizó un estudio en el espectrofluorómetro para saber a que pH se presentaba una mayor fluorescencia, se estudiaron los pHs de 7.4, 8.3, 9.7 y 10.4 con dos soluciones amortiguadoras, la de fosfatos y boratos 0.05 M.

Se encontró que la solución amortiguadora de boratos 0.05 M pH 9.7 presenta una mayor intensidad de fluorescencia en el espectrofluorómetro a una sensibilidad de 100 y abertura del monocromador de 0.5

En base a estos resultados, se realizó posteriormente el análisis por CLAR, para la solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.4, en la cual se había demostrado que se presentaba una mayor respuesta en la reacción de las encefalinas con la fluorescamina (56); y para la solución amortiguadora de boratos 0.05 M pH 9.7, para elegir el pH y el tiempo de reacción donde se presentara una mayor sensibilidad.

En la gráfica 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos, observándose que a pH 9.7 se obtiene una respuesta mayor a los 40 min. de reacción, además de estabilidad, ya que se mantiene constante hasta los 120 min de reacción aproximadamente, en cambio a pH 7.4 se observa una disminución lenta de la fluorescencia con el transcurso del tiempo

5.5 Elección de La Velocidad de Flujo

El flujo es un parámetro que afecta directamente la eficiencia de la columna, y consecuentemente la separación de los componentes de la muestra, por lo que es necesario escoger el flujo óptimo de trabajo.

La eficiencia de una columna es mejor cuanto más grande es el número de platos teóricos o cuanto más pequeño es la altura equivalente de platos teóricos (AEPT) a longitud de columna constante.

La AEPT se define como el largo necesario de la columna para lograr un equilibrio de reparto entre la fase estacionaria y la fase móvil (48).

El flujo de máxima eficiencia como se observa en la gráfica N° 4 es aproximadamente de 0.3 ml/min, que comprende el menor valor de AEPT. Se sabe que si se disminuye el flujo se producirán eluciones muy lentas, coleos y análisis deficientes, si esta disminución es muy poca respecto al flujo marcado no habrá variaciones significativas en las eluciones, solo los tiempos de retención se modifican.

Se eligió un flujo de 0.35 ml/min, por que la disminución de la eficiencia no es significativa, y solo se disminuye el tiempo de retención de las encefalinas, y por lo tanto el tiempo de análisis en un 15 % aproximadamente y el coleo de los picos.

5.6 Validación del Método

La técnica analítica desarrollada se válido estadísticamente con la finalidad de conocer su confiabilidad evaluando así los parámetros estadísticos: especificidad, precisión, exactitud y linealidad.

Antes de llevar a cabo la validación del método, se procedió a demostrar su especificidad, con este fin se sometieron a análisis los péptidos disponibles en el laboratorio (tabla N^o 2), encontrando que los tiempos de retención de estos, son diferentes a los péptidos Met-encefalina y Leu-encefalina y por lo tanto no interfieren en la medición.

La precisión se evaluó como reproducibilidad, debido a que se trabajo con dos analistas y en dos días diferentes. Los parámetros estadísticos que se evaluaron fueron la desviación estandar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza al 95 % de probabilidad, que de acuerdo a los criterios tomados como parámetros de comparación (53), se considera que el método es preciso.

Coeficiente de Variación menor al 1.5 %

Intervalo de confianza del 98 % al 102 %

Considerando la definición de exactitud, como el grado de concordancia entre un valor determinado y un valor de referencia, se cree que el más adecuado para considerar si el método cumple con las características de exactitud ó no es referirlo como una razón de medias (Anexo 1). Dicha razón debería ser en función de la media estimada y la media teórica, que en este caso sería el 100 % de recobro. Considerando este criterio el método también cumple con la característica de exactitud.

La linealidad del método se evaluó considerando seis niveles de concentración y los resultados obtenidos se ajustaron a una línea recta por un análisis de regresión, mediante el método de mínimos cuadrados (40), del que se obtuvo la ecuación de la recta:

$$\text{Met-encefalina } Y = (0.9860 \pm 0.0377) X + (0.0043 \pm 4.3930)$$

$$\text{Leu-encefalina } Y = (1.0047 \pm 0.0430) X + (0.0306 \pm 5.0035)$$

de donde: X = % Adicionado

Y = % Recuperado

Para saber si podrían considerarse el intercepto de cero y la pendiente de uno, para que el método pueda considerarse lineal, se sometieron ambos (intercepto y pendiente) a pruebas de hipótesis (Anexo 1) y se encontró que estos valores no son significativamente diferentes de cero y uno respectivamente para un nivel de confianza del 95 %

El coeficiente de correlación y variación dan valores muy cercanos a uno, por lo que puede considerarse que el comportamiento de la recta se debe a un 99.99 % a la determinación y en 0.01 % a errores al azar.

5.7. *Análisis de Muestras Biológicas*

La identificación cromatográfica puede realizarse utilizando los datos de retención. Bajo condiciones de presión y temperatura constantes, el tiempo de retención va a ser característico de un compuesto dado y para una fase estacionaria dada, por lo que puede usarse para identificar al compuesto. Tal identificación se basa en la comparación del tiempo de retención del compuesto desconocido con el obtenido de un componente conocido bajo idénticas condiciones.

Siguiendo este criterio se realizó la identificación de los picos encontrados en los cromatogramas resultantes de la muestra de tallo ocular de acocil.

La fig. 8 muestra los cromatogramas correspondientes a la Met-encefalina y la Leu-encefalina. El tiempo de retención registrado para el pico que aparece en el cromatograma de la muestra biológica, resulto ser muy cercano al registrado cuando se inyectó la solución estandar.

Para confirmar la identidad de los picos se adicionó las sustancias puras a la muestra biológica, observando un incremento de la altura del pico, con idénticos tiempos de retención (fig. 9).

Se sabe que las encefalinas son dos péptidos opioides endogenos encontrados en el sistema nervioso de vertebrados. Pero para facilitar el estudio del papel funcional, se ha empleado es sistema nervioso de invertebrados, por su accesibilidad, regularidad, pequeño número y gran tamaño de los componentes neuronales, tal es el caso de los crustáceos, que facilitan la acumulación detallada acerca de su anatomía y fisiología, por lo que es muy importante el desarrollo de métodos que permitan su determinación de manera cuantitativa. Pero en crustáceos solo existen tres estudios cualitativos por métodos inmunocitoquímicos que demuestran la existencia de encefalinas en el tallo ocular de crustáceos (12,21 y 29). Sin embargo, estos métodos inmunocitoquímicos, tienen la desventaja de presentar reacciones cruzadas entre el anticuerpo antimarcador y otros compuestos relacionados con el componente bajo estudio (37).

Este estudio, en otra especie de crustáceos confirma los reportes inmunocitoquímicos en el cual se indica que las encefalinas estan presentes en el tallo ocular de crustáceos.

Este trabajo experimental es el principio de una serie de estudios fisiológicos detallados que se realizarán en un futuro inmediato para poder elucidar la función de estos compuestos en el sistema nervioso del acocil.

6. CONCLUSIONES

Del estudio realizado y con los datos experimentales obtenidos se pueden delinear las siguientes conclusiones:

Se desarrolló y validó un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de fluorescencia, en una columna NOVA PAK C 18, para la cuantificación simultánea de Met-enkefalina y Leu-enkefalina en el tallo ocular de crustáceo *Procambarus clarkii*.

Se utilizó dos condiciones de detección de las encefalinas: con fluorescencia nativa y derivación precolumna con fluorescamina.

La fase móvil encontrada para la detección de encefalinas con fluorescencia nativa es: agua: acetonitrilo: tetrahidrofurano (7.6:1.2:1.2), en una mezcla isocrática y una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. La cantidad mínima detectada bajo estas condiciones es de 327.916 ng, por lo tanto, no es recomendable para la identificación y cuantificación de estos compuestos, por que sería necesario una gran cantidad de tejido, lo que implicaría un método muy costoso en términos de tejido y reactivos; así como de tiempo y mano de obra.

Las ventajas de utilizar estas condiciones es que permite separar y aislar las encefalinas, para la realización de otras pruebas, como son: el bioensayo para la determinación de su actividad biológica, la secuencia de aminoácidos o espectrometría de masas para la confirmación de la identidad de los picos.

La fase móvil encontrada para la detección de las encefalinas derivadas con fluorescamina es: agua: metanol: acetonitrilo (3.0:1.5:2.0), en condiciones isocráticas y una velocidad de flujo de 0.35 ml/min.

La ventaja de utilizar la derivación precolumna de las encefalinas con fluorescamina son: economía y simplicidad del método, además de sensibilidad, ya que permite la detección de estos compuestos a nivel de nanogramos (0.6211 ng)

También se demostró que está técnica es exacta y reproducible entre días y analistas.

Con este trabajo se confirma los estudios inmunocitoquímicos de la presencia de estos compuestos en el tallo ocular de crustáceo.

Con esta técnica es factible evaluar la Met-encefalina y Leu-encefalina en las diferentes regiones del organismo para poder estudiar su papel fisiológico y farmacológico.

7. REFERENCIAS

- 1) Andrew, R.D.; Orchard, I.; Sundler, F. y Thorell, J. "Neuronal localization of immunoreactive enkephalin and beta-endorphin in the earthworm", *Nature*, 279, 805-806, (1979).
- 2) Akil, H.; Maver, D.J. y Liebeskind, J.C. "Comparison chez le rat entre l'analgesie morphinique", *C.R. hedd Seanc. Acad. Sce.*, 3, 603-305, (1972).
- 3) Beaumont, A.; Fuentes, J. A., Hughes, J. y Metter, R.M. "Opioid peptide precursors in striatum" *FEBS Letts.*, 122, 135-137, (1980).
- 4) Bradbury, A.F.; Smuth, D.G.; Snell, C.R., Birdsall, N.J.M. y Hulme, E.C. "C-fragment of lipotropin has high affinity for brain opiate receptors", *Nature*, 260, 793-795, (1976).
- 5) Chamberlain, S.C. y Engbretson, G.A. "Neuropeptide immunoreactivity in *Limulus*. I. substance P-like immunoreactivity in the lateral eye and protocerebrum", *J. Comp. Neurol.*, 208, 304-315, (1982).
- 6) Corbett, A.D., McKnight, A.T. y Kosterlitz, H.W. "Tissue content of opioid peptides in the myenteric plexus longitudinal muscle of guinea pig small intestine" *Journal Neurochem.*, 51, 32-37, (1988).
- 7) Cox, B.M.; Goldstein, L. "Opioid activity of a peptide beta-endorphin (61-91), derived from beta-lipotropin" *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73. 1821-1823, (1976).

8) Currie, B.L.; Chang, J.K. y Cooley, R.J. "High performance liquid chromatography of enkephalin and endorphin peptide analogs", J. Liq. Chromatography, 3, 513-518 (1980)

9) De Bernardo, S.; Weigele, M.; Toome, V.; Monhart, K.; Leimgruber, W.; Bohlen, P.; Stein, S. y Udenfriend, S. "Studies on the reaction of fluorecamine with primary amines", Archives of Bioch. and Bioph., 163, 390-399 (1974)

9a) Desidere, L.M.; Dijkstra, A. y Kaufman, L. "Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures", Ed. Elsevier scientific publishing company, Amsterdam, 1980.

10) Dunlap III, C.E.; Gentleman, S. y Lowney, L.I. "Use of trifluoroacetic acid in the separation of opiates and opioid peptides by reversed-phase HPLC", J. Chromatography, 160, 191-198, (1978).

11) Elde, R.; Hokfelt, T.; Johanson, O. y Terenius, L. "Immunohistochemical studies using antibodies to leucine-enkephalin, initial observation on the nervous system of the rat", Neuroscience, 1, 349-351, (1976).

12) Fingerman, M.; Hanumante, M.M.; Kulkarn, G.K.; y Vacca, L.L. "Localization of substance P-like, and FMRF amide-like immunoreactivity in the eyestalk of the fiddler crab, Uca pugilator" Cell Tissue Res., 241, 473-477, (1985).

13) Gross, E. y Meienhofer "The peptides, analysis, synthesis, biology", Academic Press Inc., New York, 1981.

14) Guillemin, R.; Vargo, T.; Rossier, J.; Minick, S.; Ling, W.; Rivier, C.; Vale, W. y Bloom, F. "Beta-endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland", Science, 197, 1367-1369, (1977).

15) Hamilton, R.J. y Swell, P.A. "Introduction to high performance liquid chromatography", Chapman Hall; New York, 1979.

16) Hancock, W.S. "CRC Handbook of HPLC for the separation of amino acids, peptides, and protein", CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1985.

17) Holtt, V. "Multiple endogenous opioid peptides" Trends. Neurosci., 6, 24-26, (1983).

18) Hughes, J.; Smith, T.W.; Kosterlitz, H.W.; Fothergill, L.A.; Morgan, B.A. y Morris, H.R. "Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity", Nature, 258, 577-579, (1975).

19) Hui, K.S.; Hui, D.S. y Chan, K.K. "Separation of enkephalin from their metabolites and precursor by a single pump gradient high-performance liquid chromatography methods", J. Chromatography, 325, 467-472, (1985).

20) Jaros, P.P. "Tracing of neurosecretory neurons in the crayfish optic ganglia by cobalt iontophoresis", Cell. Tissue Res., 194, 297-302, (1978).

21) Jaros, P.P.; Dirckensen, H. y Kaller, R. "Ocurrence of immunoreactive enkephalins in a neurohemal organ and other nervous structures in the eyestalk of the shore crab, *Carcinus maenas* L. (Crustacea, Decapoda)", Cell Tissue Res. 241, 111-117, (1985).

22) Kilpatrick, D.L.; Taniguchi, T.; Jones, B.N.; Stern, S. y Udenfriend, S. "A highly potent 3200-dalton adrenal opioid peptide that contains both a (Met)- and (Leu)-enkephalin sequence" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3.265-3.268, (1981).

23) Kirkland, J.J. "Modern Practice of Liquid Chromatography" Wiley-Interscience Publication, New York, 1971.

24) Kreyszg, E. "Introducción a la estadística matemática. Principios y métodos" Edit. Limusa, México, 1979.

25) Lewis, R.V.; Stein, S.; Gerber, L.D.; Rubinstein, M. y Udenfriend, S. "High molecular weight opioid containing proteins in the striatum", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4.021-4.023, (1978).

26) Li, C.H. "Lipotropin, a new active peptide from pituitary glands", Nature (Lond.), 201, 924-927, (1964).

27) Li, C.H. y Chung, D. "Isolation and structure of an untriatecontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1145-1148, (1976).

28) Malick, J.B. y Bell, R.M. "Endorphins, Chemistry, Physiology, Pharmacology and Clinical relevance" Marcel Hepper, Inc., 1982.

29) Mancillas, J.R.; McGinty, J.F.; Selverston, A.I.; Karten, H. y Bloom, F. "Immunocytochemical localization of the enkephalin end substance P in retina and eyestalk neurons of lobster", Nature, 293, 567-578, (1981).

30) Martin, R.; Frosh, D.; Kiehl, C. y Voigh, K. H. "Molluscan neuropeptide like and enkephalin-like material coexists in octopus nerves" Neuropeptides, 2, 141-150, (1981).

31) Meek, J.L. y Bohan, T.P. "Use of high pressure liquid chromatography (HPLC) to study enkephalin" Adv. in Biochemical Psychopharmacology, 18, 141-147, (1978).

32) Meienhofer, J. "Chemistry and biology of peptides. Proceedings of the third American peptide symposium" Ann Arbor science publishers Inc., Michigan, 1972.

33) Mendez, E. Y Gavilanes, J.G., "Fluorometric detection of peptides after column chromatography or on paper: orto-phthalaldehyde and fluorecamine", Anal. Biochem., 72, 473-477, (1976).

34) Mossart, D.L., Dijkstra, A. y Kaufman, L. "Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures" Ed. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1980.

35) Mousa, S. y Couri, D. "Analysis of enkephalin, beta-endorphin and small peptides in their sequences by highly sensitive high performance liquid chromatography with electrochemical detection implications in opioid peptide metabolism", J. Chromatography, 267, 191-198, (1987).

36) Nice, E.C. y O'Hare, M.J. "Simultaneous separation of beta-lipotrophin, adrenocorticotrophic hormone, endorphin and enkephalin by high performance liquid chromatography" J. Chromatography, 162, 401-407, (1979).

37) Pasantes, H. y Arechiga, H. "Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas", UNAM, México 1983.

38) Pert, C.B. y Snyder, S.H. "Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue" Science, 179, 1011-1019, (1973).

39) Pryde, A. y Gilbert, M.T. "Applications of high performance liquid chromatography", Chapman and Hall, New York, 1979.

40) Ramette, R.W. "Equilibrio y análisis químico", Ed. Fondo Educativo Interamericano, México, 1981.

41) Remy, C.; Dubais, M.P. "Immunohistological evidence of methionine enkephalin-like material in the brain of the migratory locust", Cell Tissue Res., 218, 271-278, (1981).

42) Rossier, J.; Bayon, A.; Vargo, T.M.; Ling, N.; Guillemín, R. y Bloom, F. "Radioimmunoassay of brain peptides. Evaluation of a methodology for the assay of beta-endorphin and enkephalin", Life sci., 21, 847-851, (1977).

43) Rubinstein, M., Stein, S. y Udenfriend, S. "Isolation and characterization of the opioid peptides from rat pituitary beta-endorphin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 4969-4972, (1977).

44) Santos, G; García, U. y Arechiga, H. "Determinación de encefalinas por cromatografía líquida de alta resolución en hemolinfa de crustáceo" Congreso Nacional de Fisiología, (1988).

45) Simantov, R.; Kuhar, M.J.; Uhl, G. y Snyder, S.H. "Opioid peptide enkephalin: Immunohistochemical mapping in the rat central nervous system" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2167-2171, (1977).

46) Scharrer, E. y Scharrer, B. "Neuroendocrinbiology" Columbia University Press, New York, 1963.

47) Shah, N.S. y Donald, A. "Endorphins and opiate antagonist in Psychiatric research", Plenum Medical Book Company, New York, 1982.

48) Snyder, L.R. y Kirkland, J.J. "Introduction to modern liquid chromatography" Ed. Wiley-Interscience Publication, New York, 1976.

49) Sosa, R.P., McKnight, A.T.; Hughes, J. y Kosterlitz, H.W., "Incorporation of labelled amino acids into enkephalins" Letters, 84, 195-198, (1978).

50) Stefano, G.B. y Leung, M. "Purification of opioid peptides from molluscan ganglio", Cell. Molec. Neurobiol., 2, 347-352, (1982).

51) Szokan, G. "Pre-column derivatization in HPLC of amino acids and peptides", J. Liq. Chromatography, 5, 1493-1498, (1982).

52) Tan, L. "Simple, efficient ternary solvent system for the separation of luteinizing releasing hormone and enkephalins by reversed phase high performance liquid chromatography", J. Chromatography, 266, 67-74, (1983).

53) United States Pharmacopeia XIX, 1975.

54) Watson, S.I.; Akil, H.; Sullivan, J. Barchas, J.B. "Immunocytochemical localization of methionine enkephalin preliminary observations", Life Sci., 21, 733-739, (1977).

55) Wehr, C.T., Correia, I. y Abbot, S.R., "Evaluation of stationary and mobile phases for reversed-phase high performance liquid chromatography", J. Chromatography Sci., 20, 114-119, (1982).

56) Wu, K.M.; Sloan, I.W. y Martin, W.R. "Development of a combined high performance liquid chromatography fluorometric quantitative assay for enkephalins", J. Chromatography, 202, 500-503, (1980).

57) Yang, H.Y.T.; hong, J.S. y Costa, E., "Regional distribution of Leu- and Met-enkephalin in rat brain" *Neuropharmacology*, 16, 303-309, (1977).

FORMULAS ESTADISTICAS

$$\bar{x} = x_1 + x_2 + \dots + x_n \quad \dots (1)$$

$$\sum x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_n \quad \dots (2)$$

$$\sum y_i = y_1 + y_2 + \dots + y_n \quad \dots (3)$$

$$D.A. = |x - \bar{x}| \quad \dots (4)$$

$$D.M. = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad \dots (5)$$

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \dots (6)$$

$$S_m = s / \sqrt{n} \quad \dots (7)$$

$$C.V. = s / \bar{x} \cdot 100 \quad \dots (8)$$

$$S_{xy} = \left(\frac{\sum y_i - (\sum x_i y_i)^2 / \sum x_i^2}{n - 2} \right)^{1/2} \quad \dots (9)$$

$$S_a = s_{xy} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum x_i^2}} \quad \dots (10)$$

$$S_{bo} = S_{xy} / \sqrt{\sum x_i^2} \quad \dots (11)$$

$$b_o = \frac{\sum x_i^2 \sum y_i - \sum x_i \sum x_i y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad \dots (13)$$

$$b_i = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad \dots (14)$$

$$\sum x_i^2 = \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 / n \quad \dots (12)$$

$$\sum y_i = \sum y_i - (\sum y_i)^2 / n \quad \dots (12)$$

$$\sum XY = \sum XY - \sum X \sum Y / n$$

Procedimiento para la comparación de medias

- 1) Escoger un nivel de significancia (5 % o 1 %)
- 2) Calcular el valor de las medias \bar{X} , \bar{Y} y calcular:
 $(n_1 - 1) Sx^2$ y $(n_2 - 1) Sy^2$
- 3) Determinar el valor de "t" con la ecuación siguiente:

$$P (T \leq t) = 1 - \alpha$$

con $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad, en tablas de distribución de "t" de student.

- 4) Calcular to de:

$$to = \frac{\sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} \left(\bar{X} - \bar{Y} \right)}{\sqrt{(n_1 - 1) S^2 + (n_2 - 1) S^2}}$$

si $n_1 = n_2$

$$to = \sqrt{n} \sqrt{\frac{X - Y}{Sx^2 + Sy^2}}$$

Criterio:

$$to \leq t_{n \text{ g.l.}}$$

se acepta H_0 y por lo tanto las medias son iguales

$$to > t_{n \text{ g.l.}}$$

se rechaza H_0 y por lo tanto si hay diferencia significativa entre las medias.

Análisis de Regresión Lineal

- 1) Escoger un nivel de significancia
- 2) Calcular:

$$D = \sum x^2 - (\sum x)^2 / N$$

$$E = \sum y^2 - (\sum y)^2 / N$$

donde N = número de datos

- 3) Calcular la pendiente (B)

$$B = \frac{\sum XY - \sum X \times \sum Y / N}{D}$$

- 4) Calcular la ordenada al origen (A)

$$A = \frac{\sum Y - B \times \sum X}{N}$$

- 5) Calcular la desviación estandar de los valores Y

$$S = \sqrt{(E - B^2 \times D) / (N-2)}$$

- 6) Determinar el valor de "t" de student con $(n_x + n_y - 2)$ grados de libertad, en las tablas de distribución.
- 7) Calcular los límites de confiabilidad para la pendiente

$$b = \pm t \times S / \sqrt{D}$$

- 8) Calcular los límites de confiabilidad para la ordenada al origen

$$a = \pm t \times S \sqrt{\sum x^2 / ND}$$

Ecuación de la línea recta:

$$Y = (A \pm a) + (B \pm b) X$$

Procedimiento a seguir para prueba de hipótesis
en regresión lineal

a) Ordenada al origen (b)

- 1) Escoger un nivel de significancia
- 2) Calcular los valores de las formulas 9, 11 y 12, además el valor de b_0 de la formula 13.
- 3) Calcular t_0 de:

$$t_0 = \frac{b_0 - \beta_0}{S_{b_0}}$$

- 4) Buscar en tablas de distribución "t" student el valor de t con $n-2$ grados de libertad al nivel de significancia escogido,

b) Pendiente (b_1)

- 1) Escoger el nivel de significancia
- 2) Calcular los valores de las fórmulas 9, 10, 12 y 14
- 3) Calcular t_0 de:

$$t_0 = \frac{b_1 - \beta_1}{S_{b_1}}$$

- 4) Buscar en tablas de distribución "t" de student el valor de "t" con $n-2$ grados de libertad.

Criterio:

$$t_0 \leq t_{n, g.l.}$$

se acepta H_0 , por lo tanto no hay diferencias significativas de cero y uno para la ordenada al origen y la pendiente.

$$t_0 > t_{n, g.l.}$$

se rechaza H_0 y por lo tanto si hay diferencias significativas de cero y uno para la ordenada al origen y la pendiente

ABREVIATURAS

X	Media
S	Desviación estandar
S ²	Varianza
C.V.	Coficiente de Variación
ICS	Intervalo de confianza superior
ICI	Intervalo de confianza inferior
N	Número de determinaciones