



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

División de Estudios de Posgrado

00577
4
rej.

Desarrollo de algunas técnicas analíticas empleadas
en un laboratorio de investigación en el área
de biomedicina.

INFORME DE TRABAJO

que para obtener el grado de Maestría en
Ciencias Químicas (Química Analítica)

presenta

María de la Luz Navarro Angulo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

Abreviaturas utilizadas.

RESUMEN.

1. INTRODUCCION.

2. MARCO DE REFERENCIA.

3. ANTECEDENTES Y LINEA GENERAL DE TRABAJO.

4. PROYECTOS DE INVESTIGACION.

4.1 Variación de k' en función de pH, % de fase orgánica y concentración de par iónico para las catecolaminas y algunos de sus metabolitos.

4.2 Excreción urinaria de 3-metoxi-4-hidroxifenil-etilenglicol (MHPG) en sujetos sometidos a deprivación de sueño de movimientos oculares rápidos.

4.3 Monodesyodación organo-especifica de tironinas y actividad simpático-suprarrenal.

4.4 Metabolismo y biotransformación periférica de tironinas en ratas lactando bajo diferentes niveles energéticos (dietas).

4.5 Cuantificación de catecolaminas y algunos de sus metabolitos en líquido cefalorraquídeo de rata.

4.6 Cuantificación de catecolaminas en algunos núcleos del tallo cerebral en ratas desnutridas.

4.7 Cuantificación de catecolaminas circulantes y hepáticas en ratas bajo diferentes condiciones de alimentación.

4.8 Caracterización de diferentes subpoblaciones de gránulos cromafines en glándula suprarrenal de bovino.

4.9 Actividad 5'-monodesyodasa en sinaptosomas de cerebro de rata. Correlación con la actividad de tirosina hidroxilasa.

4.10 Organificación de yodo por Periplaneta americana.

4.11 Cuantificación de amitriptilina y nortriptilina en suero.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EXPERIMENTAL.

5.1 Catecolaminas. Aspectos bioquímicos y metabólicos.

5.2 Catecolaminas. Aspectos metodológicos.

5.3 Tirosina hidroxilasa (THO). Aspectos bioquímicos y fisiológicos

5.4 THO. Aspectos metodológicos.

6. RESULTADOS.

6.1 Variación de k' en función de pH, % de fase orgánica y concentración de par iónico para las catecolaminas y algunos de sus metabolitos.

6.2 Determinación de catecolaminas por HPLC y detección electroquímica.

6.2.1 Material y métodos

6.2.1.1 Equipo utilizado.

6.2.1.2 Estándares.

6.2.1.3 Columna y condiciones de trabajo.

6.2.2 Experimentos preliminares.

6.2.3 Tiempos de retención.

6.2.4 Medición del pico cromatográfico.

6.2.5 Cantidad mínima detectable.

6.2.6 Curva de histéresis.

6.2.7 Eficiencia de la extracción con alúmina.

6.2.8 Control de calidad.

6.2.9 Adaptación de la técnica.

6.3 Estandarización de la técnica para medir la actividad de tirosina hidroxilasa.

6.3.1 Separación de DOPA y α Me-DOPA.

6.3.2 Curvas de calibración.

6.3.3 Empleo de sephadex G-10.

6.3.4 Extracción con alúmina.

6.3.5 Adición de estándares.

6.4 Separación de hormonas tiroideas empleando cromatografía en placa fina.

6.5 Cuantificación de amitriptilina y nortriptilina en suero.

7. CONCLUSIONES.

8. BIBLIOGRAFIA.

Abreviaturas utilizadas:

A, adrenalina.
ATPasa, fosfatasa del trifosfato de adenosina.
BH2, dihidrobiopterina.
BH4, tetrahidrobiopterina.
COMT, catecol-o-metil transferasa.
D, aldehído 3,4-dihidroxi mandélico.
5 D, vía enzimática 5 desyodasa.
5'D vía enzimática 5'desyodasa.
DA, dopamina.
DBH, dopamina-B-hidroxilasa.
DDC, descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos.
DHBA, dihidroxibencil amina.
DOMA, ac. 3,4-dihidroxi mandélico.
DOPA, dihidroxifenil alanina.
DOPAC, ac. dihidroxifenil acético.
DOPEG, dihidroxifenilglicol.
DOPET, 3,4-dihidroxifenil etanol.
H, altura de la señal cromatográfica.
H/H(dhba), altura corregida por la altura del DHBA.
HHT, eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.
SHIAA, ac. 5-hidroxiindol acético.
HPLC, cromatografía de líquidos de alta eficiencia.
5-HT, serotonina.
HVA, ac. homovanílico.
k', factor de capacidad.
Km, constante de Michaelis-Menten.
MAO, monoamino oxidasa.
 α Me-DOPA, α -metil-dihidroxifenil alanina.
MeOH, metanol.
MHPE, 3-metoxi-4-hidroxifenil etanol.
MHPG, 3-metoxi-4-hidroxifeniletilén glicol.
MOR, fase de sueño de movimientos oculares rápidos.
MN, metanefrina.
3-MT, 3-metoxitiramina.
NA, noradrenalina.
NMN, normetanefrina.
OSS, octilsulfato de sodio.
PNMT, fenil-N-metil transferasa.
RIA, radioinmunoanálisis.
rT₃, triyodotironina reversa.
SAM, S-adenosil-L-metionina.
SNS, Sistema nervioso simpático.
T₄, tiroxina.
T₃, triyodotironina.
THO, tirosina hidroxilasa.
tr, tiempo de retención.
VMA, ac. vanillilmandélico.

RESUMEN

En el periodo 1986 - 1991 he estado colaborando en el grupo de investigación que encabeza el Dr. Carlos Valverde-R. en el Depto. de Fisiología del IIBM, UNAM. La línea de trabajo del grupo está encaminada a identificar y analizar los mecanismos que intervienen en el control y regulación del balance de energía u homeorresis del organismo frente a demandas fisiológicas específicas. La hipótesis de trabajo considera que una de las señales involucradas en este control es la biotransformación de la tiroxina (T_4) en triyodotironina (T_3); ambas son conocidas como hormonas tiroideas. De esta manera gran parte de los proyectos de investigación de nuestro grupo analizan, entre otros factores, la participación del sistema nervioso simpático (SNS) en la biotransformación organo-específica de estas hormonas en diferentes situaciones fisiológicas (termorregulación, lactancia, ayuno, ontogenia).

Una manera de estudiar la participación del SNS, consiste en la cuantificación de sus productos de síntesis y secreción (catecolaminas) en algunos tejidos y fluidos biológicos. De esta forma, mi participación en los proyectos de investigación del grupo ha sido fundamentalmente la implementación de metodología para cuantificar estas sustancias. Esta metodología, además me ha permitido colaborar con otros grupos de investigación del propio departamento así como de otras instituciones dentro y fuera de la UNAM.

En este informe se presentan los pasos seguidos para implementar la metodología para cuantificar catecolaminas y algunos de sus metabolitos en plasma, en líquido cefalorraquídeo, orina y en algunos tejidos. Con esta metodología se han cuantificado las aminas biogénicas: noradrenalina (NA), adrenalina (A), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) y sus metabolitos: ac. homovanílico (HVA), ac. 5-hidroxiindol acético (5HIAA), 3-metoxi-4-hidroxifeniletlen glicol (MHPG), ac. dihidroxifenil acético (DOPAC). Por otra parte también se informa la metodología para medir la actividad de tirosina hidroxilasa (THO), enzima limitante en la biosíntesis de estas aminas. Además se presentan, en forma resumida, la implementación de las técnicas para analizar productos yodados radioactivos en Periplaneta americana, y para analizar antidepresivos tricíclicos en suero. Se presentan también los resultados obtenidos en cada proyecto y las conclusiones globales.

1. INTRODUCCION.

A partir de los trabajos originales de Marshall y Harris en la década de los años 40 se reconoce la estrecha interacción funcional del sistema endócrino y del sistema nervioso (para revisión vease: Harris, 1960; Valverde-R, 1973). Esta interdependencia es particularmente clara en el caso del eje neuroendócrino hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) y la rama simpática del sistema nervioso. En efecto, los productos finales de uno y otro, es decir las tironinas y las catecolaminas participan y determinan de manera concertada el equilibrio dinámico u homeostasis del organismo en las dos siguientes situaciones fisiológicas: 1, la respuesta adaptativa de termorregulación y 2, las respuestas homeorréticas o de adaptación metabólica que determinan el balance aporte/gasto energético del organismo (para revisión vease: Fregly, 1989; Danforth & Burger, 1989).

Aunque el conocimiento de esta interacción neuroendócrina es ya clásico, el análisis fino de los mecanismos involucrados ha requerido entre otros avances el desarrollo de procedimientos analíticos de gran sensibilidad, precisión y alta especificidad. Así, en el caso de las tironinas el desarrollo del radioinmunoanálisis (RIA), a partir de 1972, ha permitido cuantificar sus concentraciones con razonable certeza (para revisión vease: Yallow, 1959; Chopra y col, 1972; Meinhold, 1986). Para las catecolaminas la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), en combinación con la detección electroquímica, aunque menos sensible y específica que el RIA, ha resuelto en gran medida el problema de su cuantificación (para revisión vease: Kissinger y col, 1973; Kagedal & Goldstein, 1988).

En este informe reporto el trabajo que he desarrollado durante el periodo 1986-1991 principalmente colaborando en el grupo de investigación que encabeza el Dr. Carlos Valverde-R. en el Departamento de Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Durante este mismo periodo he estado inscrita en la Maestría en Química Analítica. Puesto que el trabajo desarrollado ha consistido en implementar procedimientos analíticos para cuantificar la concentración de catecolaminas, de tironinas y de algunos fármacos en fluidos y tejidos biológicos, consideré pertinente dividir el presente informe en las siguientes secciones: Marco de Referencia; Antecedentes y Línea General de Trabajo; Proyectos de Investigación; Planteamiento del Problema Experimental; Resultados y Discusión; Conclusiones, y Bibliografía.

2. MARCO DE REFERENCIA.

Monodesyodación Organo - Específica de Tironinas y Homeorresis.

Las nociones de homeostasis y homeorresis son dos ideas fundamentales de la biología contemporánea. La primera abarca las respuestas o esfuerzos (estres) inmediatos y generalizados del organismo encaminados a regular y mantener relativamente constante el valor de diversas variables fisiológicas (Cannon, 1941). Por el contrario, la homeorresis incluye todos aquellos cambios o ajustes metabólicos órgano-específicos y sostenidos, que se instalan en el organismo para controlar los "puntos de ajuste" del sistema, y así alcanzar y mantener un nuevo equilibrio fisiológico (Waddington, 1976; Russek y Cabagnac, 1983). Es decir, mientras que por su carácter agudo o inmediato las respuestas homeostáticas contribuyen a mantener un "estado estabilizado"; la instalación lenta, sostenida y compartimentalizada de las respuestas homeorréticas permiten conservar un "cambio estabilizado". La instalación/operación de ambos mecanismos dá como resultado un estado funcional global del organismo conocido como adaptación (fitness).

El conocimiento y comprensión actual sobre el control y regulación de ambos tipos de respuestas es escaso y fragmentado. Sin embargo, la observación de que diferentes mensajeros intercelulares son biotransformados de manera órgano - específica generando así moléculas con bioactividad selectiva local, ha llevado a considerar que esta transformación periférica a nivel de los "órganos blanco" es parte fundamental de los mecanismos que controlan y regulan las respuestas homeorréticas del organismo (para revisión vease: Aceves & Valverde-R., 1987 y 1990).

Estas biotransformaciones "extraglandulares" son particularmente claras en el caso de las hormonas tiroideas. En efecto, en condiciones normales, la glándula tiroidea sintetiza y secreta el total de la T_4 circulante, mientras que aproximadamente el 80% de la T_3 , tironina cinco veces más activa, y la totalidad de la triyodotironina reversa (rT_3), tironina sin actividad reconocida, provienen de la monodesyodación órgano - específica de la T_4 . A la fecha se han identificado, en prácticamente todos los órganos estudiados, dos vías monodesyodativas: la vía 5' - desyodasa (5'D) o de activación y la vía 5 - desyodasa (5 D) o de inactivación. Esta denominación designa el anillo en el que ocurre la reacción, o bien, la bioactividad del producto generado. Igualmente y aunque aún no se han purificado, se conoce que estas reacciones están catalizadas por tres isoenzimas parcialmente caracterizadas y denominadas: tipo I, II y III. La primera interviene indistintamente en una u otra vía, mientras que las dos últimas son, respectivamente, específicas de las vías 5'D y 5 D (para revisión vease: Chopra y col, 1978; Engler & Burger, 1984; Kaplan, 1984 y 1986; Leonard y Visser, 1986; Koherle & Hesch, 1987; Visser, 1990).

3. ANTECEDENTES Y LINEA GENERAL DE TRABAJO.

Nuestra línea de investigación actual data de 1975 y tiene antecedentes primordialmente clínicos. Por una parte, los estudios sobre la estructura y distribución temporo - espacial del ritmo de sueño y la secreción de hormonas adenohipofisarias, en pacientes con hipotiroidismo primario antes y durante la administración de hormonas tiroideas (para revisión vease: Solis y col, 1979; Valverde-R y col, 1980; Drucker-Colin & Valverde-R, 1981; Ruiz-Primo y col, 1982). El otro antecedente se refiere a la descripción en ganado lechero del llamado "síndrome de eutiroidismo enfermo" durante la lactancia y sus modificaciones durante la aclimatación al frío o al calor (Aceves y col, 1985 y 1987).

Los hallazgos de estos estudios nos llevaron a plantear como hipótesis general de trabajo, que la monodesyodación órgano - específica de las tirocinas está regulada por algunas hormonas que intervienen en el metabolismo energético del individuo, y que esta biotransformación compartimentalizada determina y forma parte de los mecanismos y respuestas homeorréticas del organismo.

El enfoque experimental y los objetivos de esta hipótesis consisten desde el punto de vista integrativo u orgánico en describir y analizar algunas de las respuestas y mecanismos del binomio homeostasis/homeorresis que despliega el organismo durante demandas fisiológicas específicas y en diferentes periodos ontogénicos. Mientras que el enfoque analítico pretende identificar y analizar los mecanismos neuroendócrinos que regulan esta monodesyodación órgano-específica.

Sobre estas bases, hemos venido analizando la actividad desyodativa de las tirocinas en tres modelos experimentales específicos: 1), durante la lactancia; 2), durante la respuesta aguda de termorregulación al frío y 3), durante la ontogenia en especies precociales.

Una buena parte del trabajo del grupo está encaminado a estudiar la regulación y/o interrelación de las desyodasas con el SNS. Esto ha dado lugar a la mayoría de los proyectos de investigación que ha continuación señalo.

4. PROYECTOS DE INVESTIGACION.

4.1) Variación del factor de capacidad (k') en función del pH, % de metanol y concentración del octil sulfato de sodio para las catecolaminas y algunos de sus metabolitos.

Los tiempos de retención de las catecolaminas y de sus metabolitos en cromatografía de pares de iones son función de variables como fuerza iónica, longitud de la cadena del

contraíón, porcentaje de fase orgánica en la fase móvil, etc. Una buena parte del trabajo que se menciona más adelante se refiere a la separación de catecolaminas o bien de sus metabolitos, o precursores; por esta razón el objetivo de este proyecto era tener las condiciones para lograr la mejor separación posible entre estos compuestos.

4.1.1) Equipo Utilizado. Cromatógrafo de líquidos Waters, constituido por: Bomba de flujo constante modelo 510, Inyector universal modelo U6K, Detector de UV modelo 441, Módulo de datos modelo 730. Columna Novapack C18, también de Waters.

4.1.2) Diseño Experimental. Se utilizaron 3 pH's diferentes y dos concentraciones de metanol. Una vez que la columna estaba equilibrada, se obtuvieron los valores de k' para las aminas, para algunos de sus precursores y de sus metabolitos.

4.2) Excreción urinaria de MHPG en sujetos sometidos a privación de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR).

Se ha sugerido un papel importante para la NA cerebral en el control de las diferentes fases de sueño (Monti, 1983). La privación de la fase MOR se ha utilizado con fines terapéuticos en pacientes con síndrome depresivo, pero los mecanismos neurobiológicos involucrados no han sido claramente establecidos, aunque se sugiere la participación de la NA cerebral (Vogel y col. 1968). El MHPG es el principal metabolito de la NA cerebral y se ha propuesto que su concentración urinaria es un parámetro adecuado del recambio de esta amina. Así, el objetivo de este proyecto consistió en explorar la posible relación entre privación de MOR y excreción urinaria de MHPG.

4.2.1) Diseño Experimental. Se estudiaron 12 voluntarios sanos durante nueve noches consecutivas: dos de habituación, una de registro basal, cuatro de privación y dos de recuperación. En todos los casos se llevó a cabo el registro polisomnográfico durante ocho horas y se pidió a los sujetos la recolección de orina de 24 h durante todo el estudio. En 8 sujetos se privó específicamente la fase MOR, mientras que en los 4 restantes la privación se llevó a cabo y durante otra fase del sueño.

4.3) Monodesyodación organo-específica de tironinas y actividad simpático-suprarrenal.

Este proyecto analiza la probable regulación que ejerce el SNS sobre la actividad de la 5'D, en los principales órganos involucrados en la respuesta de termorregulación (hipotálamo, hipófisis y glándula suprarrenal).

4.3.1) Diseño Experimental. Se utilizaron ratas macho Wistar de 300 a 350 g alimentadas ad libitum y bajo condiciones controladas de iluminación (12 h luz/12 h oscuridad) y temperatura (22°C). El grupo experimental (expuesto a 4°C) incluyó los siguientes intervalos 15, 30, 60 y 120 min. En todos los animales se recolectó sangre del tronco por decapitación en tubos mantenidos

en hielo y recubiertos con heparina. La sangre fué centrifugada a 2000 X g por 10 min. a 4 °C y el plasma se guardó a -70 °C hasta su análisis. Este análisis incluyó: NA, A, cortisol, T₄ y T₃. Además se analizó la actividad 5'D en glándula suprarrenal, hipotálamo, hipófisis e hígado.

4.4) Metabolismo y biotransformación periférica de tironinas en ratas lactando bajo diferentes niveles energéticos (dietas)

Este proyecto analiza la actividad de la 5'D en algunos órganos y tejidos de ratas lactando. Se analiza la participación e interacción de los carbohidratos y el SNS en la regulación de la actividad de esta enzima.

4.4.1) Diseño Experimental. Se utilizaron ratas Wistar: 70 hembras primiparas lactando y 20 machos adultos. Los grupos control se alimentaron ad libitum con purina, los grupos experimentales recibieron una disolución de sacarosa al 40 % como agua para beber. Los animales se sacrificaron a las 24, 48, y 72 horas. Se analizaron los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas, catecolaminas y cortisol, y la actividad enzimática de la 5'D en glándula mamaria, hígado, hipotálamo y glándula suprarrenal.

4.5) Cuantificación de metabolitos ácidos de catecolaminas en liquido cefalorraquídeo de rata.

Este trabajo formó parte de un proyecto en colaboración con el Dr. Rene Drucker del IFICE. Se trataba de establecer el perfil (niveles) de catecolaminas y de sus metabolitos en liquido cefalorraquídeo de ratas control, para posteriormente evaluar las modificaciones que ocurrían en ratas experimentales (transplante de médula suprarrenal a cerebro).

4.6) Cuantificación de catecolaminas en algunos núcleos del tallo cerebral de ratas desnutridas.

Este proyecto es parte de una colaboración establecida con el Dr. León Cintra del IIBM. Se analiza el impacto de la desnutrición en los patrones de sueño y en los niveles de NA, A, DA y 5-HT en los núcleos supraquiasmático, Locus Coeruleus y Raphé Dorsalis.

4.6.1) Diseño Experimental. Antes, durante y después de la gestación, las ratas madres son sometidas a dietas que sólo contienen el 6 y 8 % de proteínas de la dieta normal. El grupo control recibe el 25 %. Las crías se analizan a los 30 y 60 días de edad. El análisis consiste en registrar el patrón de sueño, sacrificarlas y obtener los núcleos ya mencionados para la determinación de NA, A, DA y 5-HT.

4.7) Cuantificación de catecolaminas circulantes y hepáticas en ratas bajo diferentes condiciones de alimentación.

Este estudio se realizó en colaboración con el Dr. Radu Racotta (ENCB-IPN), y formó parte del proyecto de Tesis de Maestría del Biol. Illie Racotta. Mi participación en este proyecto consistió en asesorar a dicho estudiante para estandarizar la metodología a sus necesidades.

Dentro de las teorías para explicar el control de la ingesta de alimento destaca la teoría hepatostática, que propone la posible participación de las catecolaminas hepáticas en la saciedad preabsortiva. En este estudio se analizan los niveles de catecolaminas hepáticas en ratas sometidas a diferentes estados de alimentación.

4.7.1) Diseño Experimental. Se utilizaron ratas Wistar hembras, con pesos entre 200 y 300 g. Se colocaron al menos una semana antes en cajas individuales y se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura controladas; recibieron agua y comida ad libitum. Los animales se sometieron a diferentes condiciones de alimentación: alimentación ad libitum, ayuno de 18 hs, realimentación durante 20 min después de un ayuno de 18 hs. Después de lo cual se sacrificaron por decapitación, bajo anestesia o sin ella. Se analizó el peso corporal, el peso del hígado, los niveles sanguíneos y hepáticos de NA y A y glucosa en sangre.

4.8) Caracterización de diferentes subpoblaciones de gránulos cromafines en glándula suprarrenal de bovino.

Este trabajo forma parte de un proyecto de colaboración con la Dra. Dalila Martínez de Muñoz (CINVESTAV-IPN). Se pretende separar las diferentes poblaciones de gránulos cromafines y caracterizarlos bioquímica y morfológicamente.

4.8.1) Diseño Experimental. Las glándulas suprarrenales se disectan en médula y corteza; la médula se homogeneiza y se somete a un gradiente discontinuo de Percoll (60, 50, 45 y 40 %). En cada fracción se determinan proteínas totales, A, NA, dopamina-B-hidroxilasa, acetil colinesterasa, fosfatasa del trifosfato de adenosina (ATPasa) y monoaminoxidasa.

4.9) Actividad 5'D en sinaptosomas de cerebro de rata. Correlación con la actividad de tirosina hidroxilasa (THO).

Este proyecto se encuentra directamente bajo mi responsabilidad. En su fase actual (inicial) forma parte del trabajo de Tesis de Licenciatura del estudiante de Biología Gustavo Guzmán.

En la rata, la 5'D hipotalámica se incrementa en respuesta al frío (Anguiano y col, 1991). En este proyecto se pretende, en una primera instancia analizar la distribución subcelular de esta actividad enzimática en ratas controles y en ratas sometidas a frío. Así mismo se comparará esta distribución con la obtenida para THO.

4.9.1) Diseño Experimental. Se utilizaron ratas macho Wistar adultas de 200-250 g de peso aproximadamente, con alimentación y agua ad libitum. Los animales se dividieron en grupo control (mantenido a temperatura ambiente) y grupo experimental (temperatura a 4 °C). Estos últimos fueron expuestos al frío durante 15, 30, 60 y 120 minutos.

A los tiempos señalados, los animales se sacrificaron por decapitación, se colectó la sangre del tronco y se disectaron: el hipotálamo, la corteza fronto-temporal y el cerebelo.

4.9.2) Procedimientos Analíticos. Se determinaron los niveles circulantes de hormonas tiroideas por RIA, los niveles tisulares de catecolaminas por HPLC, la actividad 5' D Tipo II por liberación de radioyodo liberado, la THO midiendo, por HPLC, la cantidad de dihidroxifenilalanina (DOPA) liberada y las proteínas por el método de Lowry (Lowry y col, 1951)

Se separaron los sinaptosomas por medio de técnicas de ultracentrifugación en gradientes de densidad discontinua de sacarosa de acuerdo a Dodd, 1981; Loscher y col, 1985; Gordon-Weeks, 1987.

4.10) Separación de hormonas tiroideas empleando cromatografía en capa fina.

Esta metodología formó parte del proyecto de tesis del estudiante Hector Ongay (Licenciatura en Investigación Biomédica Básica). Se quería discernir si el yoduro es capaz de unirse a moléculas orgánicas (organificarse) en insectos, y de que tipo serían éstas.

4.10.1) Diseño Experimental. El insecto que se utilizó fue Periplaneta Americana. Se utilizaron 15 individuos adultos a los que se le administró Na¹²⁵I y después de algunos días (entre 11 y 58) se sacrificaron. Se analizó el % de radiactividad en exoesqueleto, linfa y tejido parenquimatoso. Los extractos de linfa se sometieron a análisis por cromatografía en capa fina.

4.11) Cuantificación de amitriptilina y nortriptilina en suero.

Este proyecto fué realizado en el Instituto Mexicano de Psiquiatría bajo la asesoría del Dr. A. Bayón. Los antidepresivos tricíclicos se emplean para el tratamiento de la depresión endógena; pero a pesar de dar dosis similares, la respuesta clínica observada es muy variable. Se ha propuesto que esta

respuesta está mejor correlacionada con los niveles plasmáticos de estos fármacos que con la dosis ingerida. En este contexto resultaba necesario contar con un método para cuantificar estos fármacos en plasma.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EXPERIMENTAL.

Como puede apreciarse, la mayoría de los proyectos señalados requería de la cuantificación de catecolaminas y de algunos de sus metabolitos en fluidos y tejidos biológicos, así como de la THO, enzima limitante en la biosíntesis de las catecolaminas. Por esta razón y antes de presentar los resultados de mi trabajo, consideré pertinente revisar de manera resumida los aspectos bioquímicos y metabólicos más relevantes de estas moléculas. En esta sección enfatizo particularmente aquellos aspectos relacionados con la metodología desarrollada para su cuantificación.

5.1) Catecolaminas. Aspectos bioquímicos y metabólicos

Se aplica el nombre de catecolaminas a los compuestos 1-R-3,4-dihidroxibencenos, donde R contiene un grupo amino. Sin embargo en la práctica, este término se utiliza para denominar a la 3,4-dihidroxifenil etil amina (DA) y a sus productos metabólicos 1 - (3,4-dihidroxifenil) - 2 - aminoetanol (NA) y 1 - (3,4-dihidroxifenil) - 2 - (metilamino) etanol (A).

Las catecolaminas derivan del aminoácido tirosina y constituyen una familia de mensajeros intercelulares extraordinariamente versátil. Se ha demostrado su participación en la transferencia de información simpática, actuando como neurotransmisores, su participación en la información neurohormonal, actuando como moduladores neurohormonales, o como hormonas. Por otra parte se reconoce que diversos estímulos fisiológicos; vgr., el calor, el frío, la tensión emocional, la hipoglucemia, la hemorragia y la asfixia, así como numerosos fármacos y factores aún no definidos, estimulan la liberación de las catecolaminas a la circulación sistémica y provocan gran parte de los efectos observados en la llamada reacción de alarma (para revisión veanse: Kopin, 1977; DeQuattro & Campese, 1979).

En las figuras 1 y 2 se presentan esquemas de la biosíntesis y su metabolismo respectivamente.

5.2) Catecolaminas. Procedimientos Analíticos (Revisión de la Literatura).

Para su análisis en los diferentes fluidos biológicos se han utilizado bioensayos, ensayos colorimétricos, ensayos radioenzimáticos, análisis por cromatografía de gases, acoplada a detector de captura de electrones o a un espectrómetro de masas, y HPLC con detectores UV, de fluorescencia y electroquímico.



FIGURA 1. Biosíntesis de las catecolaminas. Las catecolaminas se sintetizan en cerebro, células cromafines, nervios y ganglios simpáticos a partir del aminoácido tirosina. La secuencia de reacciones se inicia con la formación de DOPA, reacción catalizada por tirosina hidroxilasa (THO), a nivel del citoplasma. Posteriormente la DOPA pierde un grupo carboxilo, dando lugar a la DA. Esta reacción tiene lugar en el citoplasma y es mediada por una enzima no específica denominada descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (DDC). La DA es convertida a NA dentro de los gránulos cromafines o de las vesículas de secreción, en donde se localiza la DA- β -hidroxilasa (DBH), enzima que cataliza esta reacción. Finalmente en los tejidos que contienen feniletanolamina-N-metil transferasa (PNMT), la NA puede dar lugar a la A. Esta reacción se lleva a cabo en el citoplasma.

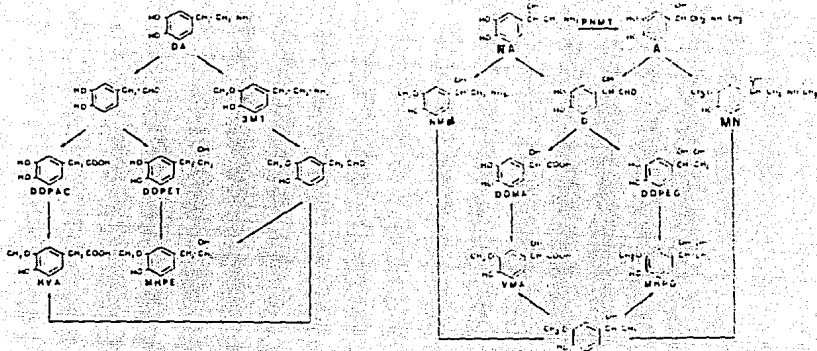


FIGURA 2. Metabolismo de las catecolaminas. Las enzimas más importantes, en mamíferos para la degradación de las catecolaminas son la monoaminooxidasa (MAO) y la catecol-o-metil transferasa (COMT). La MAO convierte a las catecolaminas en sus respectivos aldehídos. Estos aldehídos son rápidamente metabolizados a sus ácidos correspondientes por una aldehído deshidrogenasa. O bien son reducidos a alcoholes o glicoles por una aldehído reductasa. La COMT es una enzima no específica que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil metionina al grupo m-hidroxi de las catecolaminas y de otros catecoles. Las abreviaturas de los compuestos se encuentran en la pag. 4.

Bioensayos:

Los métodos de análisis biológico o bioensayos más sensibles para cuantificar NA y A son: la relajación del intestino grueso (ciego) del pollo y el aumento de la presión arterial de la rata con sección espinal alta.

Ensayos fluorométricos y colorimétricos:

Las catecolaminas NA y A poseen fluorescencia nativa muy débil que puede incrementarse de dos maneras: i) mediante la oxidación y ciclización a un trihidroxiindol; o bien ii) oxidación a quinonas y posterior condensación con etilendiamina.

i) Respecto a la primera de estas reacciones, Von Euler y Hamberg (1949) describieron el método para convertir la adrenalina en adrenolutina (1-metil, 3,5,6-trihidroxiindol), la cual tiene características fluorescentes que permiten su detección. El método original ha tenido modificaciones que han permitido la diferenciación entre A y NA, tanto en el paso de oxidación, como en la cuantificación óptica. Variando el pH, O'Hanlon y col, 1970 pudieron cuantificar A y NA en plasma humano, cabe mencionar que utilizaron una cantidad considerable de sangre (20 a 30 ml).

ii) La oxidación a quinona fue ideada por Natelson y col., en 1949. Esta manipulación permitió determinar DA.

Ambos métodos se han combinado con HPLC.

Ensayos Radioenzimáticos:

Estos métodos consisten en marcar radiactivamente catecolaminas utilizando ensayos enzimáticos. Se han utilizado las enzimas: fenil-N-metil transferasa (PNMT) y catecol-o-metil transferasa (COMT) que transfieren un grupo metilo marcado con ^3H o con ^{14}C del compuesto S-adenosil-L-metionina (SAM) a la amina en cuestión.

PNMT Saelens y col. (1967) emplearon SAM marcada con ^{14}C para determinar NA en cerebro, la ^{14}C -A formada se separó del donador marcando empleando cromatografía en papel. Iversen & Jarrot (1970) emplearon ^3H -SAM. Posteriormente algunos grupos (Molinoff y col, 1971; Henry y col, 1975) emplearon PNMT purificada. Otros emplearon plasma prepurificado (Lake y col, 1976; Weise & Kopin, 1976; Falke y col, 1978).

COMT. El ensayo radioenzimático utilizando COMT fue originalmente descrito por Engelman y col en 1968 para la determinación de A y NA. Ellos emplearon ^{14}C -SAM como donador de grupos metilos y ^3H -NA como trazador para calcular recuperación. Coyle & Henry (1973) ampliaron la técnica para incluir además DA. Passon & Peuler, 1973, después de un cuidadoso análisis del procedimiento lograron aumentar la sensibilidad de la técnica original más de 10 veces; Peuler & Johnson, 1977, añadieron un

inhibidor de DOPA descarboxilasa, para prevenir la interferencia de DOPA en el ensayo de DA. Añadiendo DOPA descarboxilasa es posible determinar la cantidad de DOPA (Johnson y col, 1978). Así mismo, utilizando los métodos de separación adecuados, se han hecho determinaciones de algunos de los metabolitos y precursores de las catecolaminas (Tiede & Kehr, 1981; Fekete y col, 1978; Saller & Zigmund, 1978; Vlachakis y col, 1979).

Cromatografía de gases:

La cromatografía de gases requiere de la formación de derivados volátiles de las aminas o de sus metabolitos a detectar. Se han publicado numerosos artículos de cromatografía de gases en combinación con el detector de captura de electrones. Algunos de estos son los siguientes: Lhunguenot y Maume, en 1974, utilizaron derivados pentafluorobencil trimetilsililados de catecolaminas. Nelson y col, 1979, utilizaron derivados N,O-dipentafluoropropionil etílicos para determinar metanefrina (MN) y normetanefrina (NMN). Nuestro grupo adaptó algunas de estas técnicas para determinar valores controles de catecolaminas y sus metabolitos en orina de voluntarios sanos (Moreno y col, 1983; Navarro y col, 1983)

Se han utilizado trimetilsilil y tert-butildimetil silil derivados en combinación con el detector de ionización de flama para algunos metabolitos como MHPG, ac. vanillilmandélico (VMA), HVA, DOPAC y dihidroxifenilglicol (DOPEG), (Muskiet y col, 1977; 1981; Muskiet & Groen, 1979).

En 1972 se utilizó la cromatografía de gases en combinación con la espectrometría de masas para la determinación de catecolaminas y de HVA (Koslow y col, 1972; Karoum y col, 1972; Sjöquist & Anggard, 1972). Luhugenot y Maume, 1974, determinaron DA y NA en extractos de glándula adrenal. Muskiet y col, 1979, utilizaron trimetil silil-N-trifluoroacetil derivados para el análisis de DA, NA y A en orina. Robertson y col, 1978, utilizaron derivados pentafluoropropiónicos para analizar M y NM en orina. Para la determinación de DA, NA, A 6-hidroxidopamina y 3-metanefrina se utilizaron derivados con anhídrido trifluoroacético y con dimetil-n-propilsililimidazol (Miyasaki y col, 1981).

Cromatografía de líquidos:

La determinación de las catecolaminas empleando HPLC depende de factores tales como: columna, detector empleado, purificación y/o derivatizaciones previas a la introducción de la muestra al sistema cromatográfico.

Columna.

Inicialmente se utilizó cromatografía en fase normal (sílica), sin embargo no tuvo gran aceptación. Posteriormente se utilizaron los intercambiadores catiónicos para la separación de las aminas protonadas (Ueda y col, 1977; Hjendahl y col, 1979), así como para la separación de algunos metabolitos metoxilados

(Ponzo y col, 1981). Medford y col (1987), recientemente utilizaron un intercambiador catiónico (N-metil oleil taurato) que reacciona semi-irreversiblemente con las columnas de fase reversa para la separación DA, NA y A y han vuelto a despertar interes en este tipo de cromatografía. Molnar y Horváth, 1976, utilizaron fase reversa para la separación de compuestos catecólicos, ellos mostraron la gran influencia del pH en la separación de las aminas y de sus metabolitos ácidos.

La técnica más utilizada ha sido la cromatografía de pares iónicos. Persson y Karger, en 1974, utilizaron esta técnica para la separación de aminas, aminoácidos, ácidos carboxílicos, aminas biogénicas y sus metabolitos.

Detectores.

Detector UV. Debido a su pobre sensibilidad, este detector sólo se ha utilizado en algunos casos para determinar metabolitos en orina de pacientes con tumores secretores de catecolaminas (Krstulovic y col, 1979), ya que en estas condiciones las cantidades son muy elevadas.

Detector de Fluorescencia. El detector de fluorescencia ha sido mucho más utilizado que el de UV. Krstulovic y Powell, 1979, utilizaron la fluorescencia nativa de NA y DA para su detección en extractos de cerebro y de corazón. Jackman, 1981, utilizando un paso previo de purificación, pudo cuantificar estos compuestos en muestras de orina. Anderson y col, 1981, usaron además alúmina para concentrar las catecolaminas, incrementando la sensibilidad del método. Para la determinación de metoxicatecoles, Jackman, 1982, utilizó extracciones con disolventes orgánicos. Julien y col, 1985 utilizaron la detección fluorométrica junto con la electroquímica, para asegurar la identificación positiva de los picos cromatográficos. Algunos metabolitos como el MHPG y el VMA poseen fluorescencia nativa y se han podido detectar en orina (Taylor, 1981; Anderson, 1985).

Además de utilizar la fluorescencia nativa se han empleado algunas reacciones de derivatización para aumentar la fluorescencia de estos compuestos. Entre los reactivos utilizados, algunos ya mencionados, se encuentran el hidroxindol, la fluorescamina (Imai, 1975; Imai y col, 1977), el o-ftalaldehído (Froelich y Cunningham 1978), la etilendiamina (Mori e Imai 1985), la 1,2-difeniletildiamina (Nohta y col, 1984; Mitsui y col, 1985), la glicina (Seki y col, 1985) y el peryodato (Flood y col 1979; Flood & McComb, 1981; Abe & Konaka, 1988).

Detector electroquímico. Kissinger y col, en 1973, fueron los primeros en utilizar al detector electroquímico para cuantificar catecolaminas en cerebro. A partir de entonces se ha popularizado enormemente esta técnica.

Aunque se han utilizado diversos materiales para los electrodos de trabajo (oro, platino, gota de mercurio, carbón), para las aminas biogénicas el material más utilizado ha sido el carbón, ya sea en pasta o vidriado. Inicialmente se utilizó la pasta de carbono, la cual era fácilmente intercambiable. Sin embargo, y debido a que su superficie se deterioraba muy rápidamente con el flujo de fase móvil, en especial cuando ésta contenía concentraciones elevadas de disolventes orgánicos, la pasta fue sustituida por carbón vidriado.

Generalmente se utilizan dos tipos de celdas. La más popular es la de flujo en capa fina. En los detectores que tienen este tipo de celdas, sólo una pequeña parte de las sustancias que pasan por él son oxidadas (detección amperométrica) y producen la señal detectada en el registrador. En el otro tipo de celda, el efluente de la columna atraviesa una matriz porosa de carbón vidriado, y toda la sustancia electroactiva es oxidada (detección coulombimétrica); con este tipo de detectores se obtienen señales mayores, pero también se incrementa el ruido. Su ventaja sobre el primer tipo de detectores se pone de manifiesto cuando se utilizan 2 o más de ellos en serie (Minegishi y Ishizaki, 1984; Rizzo y Melzi d'Eril, 1987).

Prepurificación. Como procedimientos de limpieza previos a la introducción de la muestra al sistema cromatográfico, se han empleado diversos métodos; el más simple ha sido la precipitación de proteínas con ácido perclórico e inyección del sobrenadante (Warnhoff, 1984). También se ha utilizado la extracción líquido-líquido con disolventes como éter etílico o acetato de etilo (Yoshida y col, 1982; Picard y col, 1985). Una de las técnicas más empleadas ha sido la desarrollada por Anton y Sayre (1962), esta técnica consiste en la adsorción, a pH alcalino, de las catecolaminas en alúmina activada y su desorción a pH ácido. Este método también se ha usado para purificar DOPA, DOPEG y DOPAC (Eisenhofer y col, 1986).

Con este mismo propósito se han empleado resinas intercambiadoras de cationes. Odink y col, en 1986, utilizaron Bio Rex 70 para la extracción de NM, M, 3-metoxitiramina (3-MT), A, NA, DA y algunos otros compuestos.

5.3) Tirosina hidroxilasa. Aspectos bioquímicos y fisiológicos

La THO existe en forma de un homotetrámero, con un peso molecular de aproximadamente 60,000 d en cada unidad (Cooper y col, 1986; Nedergard, 1988). La THO es la enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas. Está presente en cerebro, médula adrenal y en tejidos con innervación simpática. Es estereoespecífica y requiere O_2 , Fe^{2+} y tetrahidropteridina como cofactores. Oxida a la L-tirosina y en menor grado a la L-fenilalanina. Se han reportado valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) para la conversión de tirosina a DOPA de aproximadamente 2×10^{-5} M para enzima aislada de médula suprarrenal y de 0.4×10^{-5} M para preparaciones de sinaptosomas.

La enzima es inhibida por cuatro grupos principales de compuestos; análogos de aminoácidos, derivados catecólicos, tropolonas y quelantes selectivos de hierro.

La tetrahydrobiopterina (BH_4), que es el cofactor endógeno, es oxidada a BH_2 durante la formación de DOPA, y es regenerada por una segunda enzima, llamada dihidropteridina reductasa, a la cual recientemente se le ha señalado un papel importante en la regulación de la biosíntesis de las catecolaminas (Nagatsu, 1988).

La actividad de la THO se encuentra sujeta a una regulación cinética compleja por las concentraciones de su sustrato y de sus cofactores en el citosol. Además de esta regulación a corto plazo, existe una regulación a largo plazo, que involucra su síntesis "de novo" (Zigmond y col, 1989).

5.4) THO. Procedimientos analíticos (Revisión de la literatura).

Para cuantificar la actividad de esta enzima se han empleado métodos radiométricos que utilizan tirosina marcada con 3H o con ^{14}C . La DOPA formada se separa del precursor y se cuenta su radiactividad empleando un contador de centelleo (Waymire y col, 1971). También se ha utilizado la formación de derivados fluorescentes de DOPA (Nagatsu y Yamamoto, 1968). O se ha acoplado con dihidropteridina reductasa y un sistema regenerador de NADHP (Brenneman & Kaufman, 1964). Más recientemente se ha utilizado HPLC en combinación con la detección electroquímica (Nagatsu y col, 1979; Philipp, 1987).

6. RESULTADOS EXPERIMENTALES

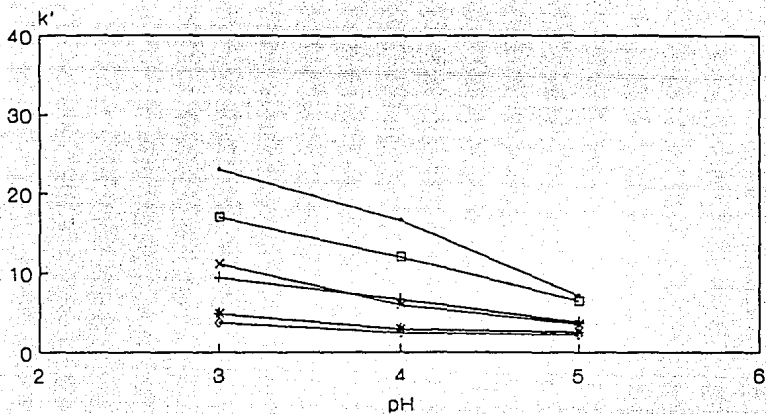
6.1) Variación de k' en función del pH, % en metanol y concentración del octil sulfato de sodio para las catecolaminas y algunos de sus metabolitos.

En las figuras 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos para dos porcentajes de metanol y para 3 valores de pH. Como era de esperarse al incrementarse el porcentaje de metanol en la fase móvil se reduce significativamente k' .

El pH prácticamente no tiene influencia en el valor de k' para los compuestos neutros. En el caso de las aminas, cuyos pK 's están muy por encima del intervalo de pH analizado, el incremento en pH aumenta ligeramente su k' .

En los compuestos ácidos k' varía en forma inversa al pH, esta variación es mucho más marcada que en el caso de las aminas.

MeOH 10 %



MeOH 5 %

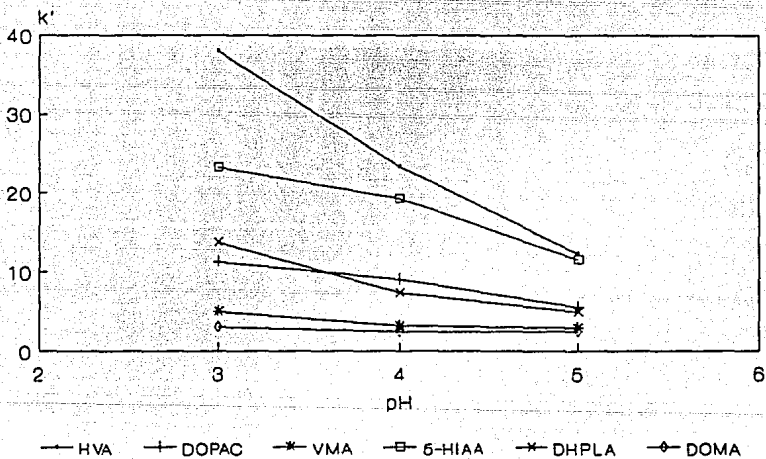
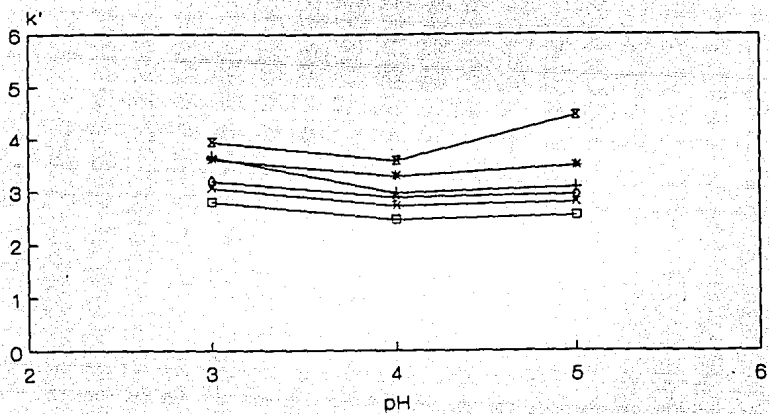
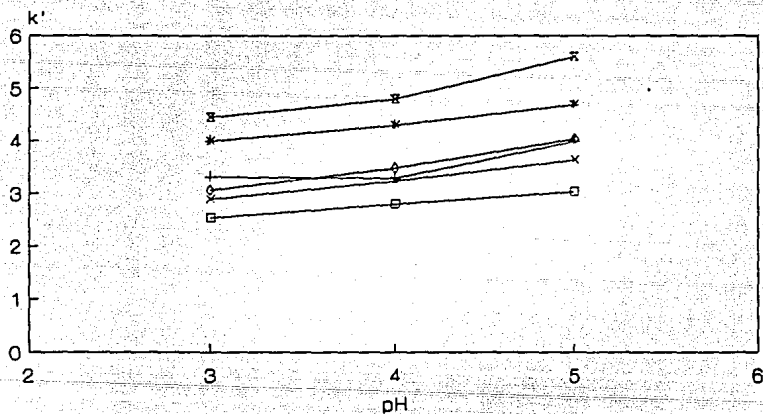


FIGURA 3. Factor de capacidad (k') en función del pH. Compuestos ácidos. Se utilizó una columna Novapack C18 y como fase móvil una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a los pH's señalados y con 5 y 10 % de metanol. Detector UV, $\lambda = 254$ nm.

MeOH 10 %



MeOH 5 %



— MNM * DA □ NA * A ◊ DHBA — MN

FIGURA 4. Factor de capacidad (k') en función del pH. Aminas y compuestos neutros. Condiciones iguales a la figura 3.

El comportamiento de k' en función del % de metanol y del pH de la fase móvil se puede explicar tomando en cuenta que el mecanismo de separación es de hidrofobicidad (para revisión vease: Horváth y Melander, 1976).

Aunque no se probó la variación de k' en función de la concentración de contraión, en la literatura (Taylor y col, 1983) se indica que, para las aminas, la k' varía linealmente con la concentración de contraión (dodecil sulfato de sodio) adsorbido sobre la superficie de la fase estacionaria, hasta alcanzar un máximo y después disminuir, lo que corresponde a un mecanismo de intercambio iónico - desolvación. Para los compuestos neutros se obtienen k' muy pequeñas y se reducen aún más al incrementarse la concentración de contraión. Para los compuestos ácidos hay una disminución significativa de k' al aumentar el pH y la concentración de contraión debidas a un efecto de repulsión entre las cargas del contraión y del soluto aniónico.

6.2 Determinación de catecolaminas por HPLC y detección electroquímica.

6.2.1) Materiales y Métodos

6.2.1.1) Equipo utilizado. Cromatógrafo de líquidos Waters, consta de: Bomba de flujo constante modelo 510, Inyector universal modelo U6K, Módulo de datos modelo 730. Detector electroquímico BAS modelo LC-2A y Detector electroquímico LKB 2143.

6.2.1.2) Estándares. Se utilizaron estándares de NA, A, DA, 5 - HT y dihidroxibencilamina (DHBA) de Sigma Chem. Co. Se prepararon disoluciones patrón de 10 mg cada una en 100 ml de HCl 0.1 M. De aquí se tomaron alicuotas para preparar las disoluciones de trabajo.

6.2.1.3) Columna y condiciones de trabajo. Se empleó una columna de octadecilsilano: NOVAPAK C18 de Waters. Inicialmente se empleó como fase móvil una disolución amortiguadora de monocloroacetatos 0.03 M, pH 3.5, EDTA 0.002 M, octilsulfato de sodio (OSS) 0.1 mM (BAS Application Note 14) a un flujo 0.7 ml/min.

6.2.2) Experimentos preliminares.

Estos experimentos se consideran preliminares porque se realizaron con el detector BAS LC-2A, cuyo electrodo de trabajo era de pasta de carbón, el cual por el rápido deterioro de su superficie da respuestas muy variables. Los resultados de estos experimentos se describen en los incisos 6.1.3 a 6.1.8; algunos fueron repetidos con el detector LKB 2143, cuando este sea el caso se indicará en el inciso en cuestión.

TABLA 1. TIEMPOS DE RETENCION EN COLUMNA PSEUDOACONDICIONADA

Estándar	Intervalo (min)	$\bar{x} \pm s$	n
NA	3.0-4.0	3.3 \pm 0.3	13
A	5.2-8.0	6.7 \pm 0.8	12
DHBA	6.2-9.6	7.9 \pm 1.1	11
DA	17.5-18.3	16.1 \pm 2.3	11

Los valores representan los tiempos de retención en minutos para los diferentes estándares.

6.2.3) Tiempos de retención. Influencia del tiempo de acondicionamiento.

En la tabla 1 se muestran los tiempos de retención obtenidos para los diferentes estándares inyectados. Es evidente que existe una gran variación. Al analizar estos datos en función del tiempo de acondicionamiento de la columna que abarcó el intervalo de 0.5 a 4.5 horas (figura 5), se observó que estos variaban linealmente en función de dicho intervalo de acondicionamiento. Esto puede explicarse tomando en consideración los mecanismos involucrados en la cromatografía de pares de iones. (Para revisión véase: Vera, 1980; Del Rey, 1989). El tiempo de retención depende de la cantidad de contraión fijada en la fase estacionaria, y ésta a su vez depende de la concentración de contraión en la fase móvil. Además, antes de que la columna esté equilibrada, la concentración de par iónico en fase estacionaria depende de la cantidad de contraión que se ha hecho pasar por la columna hasta alcanzar una meseta. Si la concentración del contraión en la fase móvil es muy pequeña, esta meseta tarda mucho en alcanzarse.

Por esta razón se decidió no lavar la columna al final de cada jornada de trabajo. Una vez acondicionada al inicio de la jornada, se dejaba en refrigeración durante la noche, o con un flujo de 0.1 ml/min, y sólo se lavaba los fines de semana. Con esto la dispersión de los tiempos de retención se redujo significativamente, aproximadamente 5 veces (ver tabla 2).

6.2.4) Medida del pico cromatográfico.

Para llevar a cabo estos experimentos se modificó el pH de la fase móvil, ya que de acuerdo con Moyer y Jiang (1978), a pH de 4.5 había una mejor respuesta del detector. Ellos encuentran que la respuesta del detector se incrementa al incrementarse el pH, para valores de pH entre 2 y 4. Entre 4 y 6 la respuesta alcanza un máximo y a pH's mayores de 6 decrece con el incremento de pH. El incremento puede explicarse considerando que el grupo catecol se oxida más fácilmente a pH's mayores (Mentasti y cols., 1973), o bien que a pH's mayores a 3 la reacción de oxidación de las catecolaminas sigue un mecanismo: Electroquímico-químico-químico, que da como resultado un número aparente de electrones de 4, en comparación con los 2 electrones involucrados cuando la reacción se lleva a cabo a pH's menores (Hawley y cols., 1967). El decremento puede explicarse considerando que a pH's mayores de 6 las catecolaminas se oxidan espontáneamente en presencia de las superficies metálicas presentes en el sistema cromatográfico.

Por esta razón cambiamos de disolución amortiguadora, la fase móvil utilizada fue una disolución de acetatos 0.1 M, pH 4.5, EDTA 0.01 M, OSS 0.1 mM (esta modificación no tiene efecto en el tiempo de acondicionamiento). En estas condiciones y durante tres días seguidos se inyectó una mezcla de 250 y 500 pg de las diferentes aminas y DHBA (250 pg) por quintuplicado. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 3 y 4.

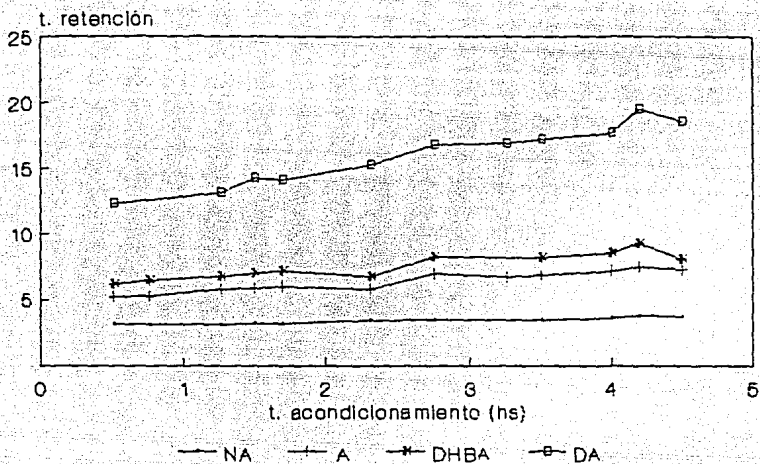


FIGURA 5. Tiempos de retención (t_r) en función del tiempo de acondicionamiento. Se presentan los t_r en minutos, para NA, A, DHBA y DA obtenidos a diferentes tiempos de acondicionamiento (en hs) de la columna. Columna: Novapack C18. Fase móvil: Monoacetoacetatos 0.03 M pH 3.5, EDTA 2 mM, OSS 0.1 mM. Flujo 0.7 ml/min. Detector BAS LC-2A.

TABLA 2. TIEMPOS DE RETENCION CON LA COLUMNA ACONDICIONADA

Estándar	Intervalo (min)	$\bar{x} \pm s$	n
NA	3.3-3.4	3.36 \pm 0.05	5
A	6.9-7.1	7.06 \pm 0.15	5
DHBA	8.6-8.9	8.76 \pm 0.19	5
DA	17.5-18.3	18.00 \pm 0.41	5

Los valores representan los tiempos de retención para los diferentes estándares mencionados.

TABLA 3 DIFERENTES FORMAS DE MEDIR EL PICO CROMATOGRAFICO

NA (250 pg)			
	1er dia	2o dia	3er dia
H	7.0 ± 0.33 (4.7)	5.4 ± 0.10 (1.9)	5.9 ± 0.30 (4.4)
H/HDHBA	1.1 ± 0.03 (2.9)	1.1 ± 0.05 (4.4)	1.2 ± 0.08 (6.8)
A	2.1 ± 0.10 (4.7)	2.2 ± 0.04 (1.8)	2.2 ± 0.05 (2.3)
A/ADHBA	0.9 ± 0.03 (3.1)	0.8 ± 0.07 (8.7)	0.9 ± 0.06 (6.8)
(500 pg)			
H	10.3 ± 0.44 (4.3)	12.0 ± 0.22 (1.9)	12.4 ± 0.17 (1.4)
H/HDHBA	2.1 ± 0.14 (6.2)	1.8 ± 0.11 (6.1)	1.7 ± 0.04 (2.5)
A	3.9 ± 0.27 (6.7)	3.6 ± 0.07 (1.9)	3.7 ± 0.05 (1.4)
A/ADHBA	1.3 ± 0.03 (2.5)	1.3 ± 0.07 (5.3)	1.3 ± 0.07 (5.0)
A (250 pg)			
H	5.8 ± 0.13 (4.7)	5.7 ± 0.11 (2.0)	5.2 ± 0.10 (1.8)
H/HDHBA	0.9 ± 0.02 (2.4)	1.1 ± 0.06 (5.2)	1.0 ± 0.02 (2.2)
A	2.3 ± 0.05 (2.2)	2.8 ± 0.12 (4.4)	2.6 ± 0.12 (4.5)
A/ADHBA	0.9 ± 0.03 (3.3)	0.8 ± 0.07 (8.8)	1.0 ± 0.03 (2.9)
(500 pg)			
H	10.1 ± 0.32 (3.2)	12.6 ± 0.22 (1.9)	13.0 ± 0.26 (2.0)
H/HDHBA	2.1 ± 0.11 (5.4)	1.8 ± 0.12 (6.1)	1.8 ± 0.05 (2.5)
A	5.7 ± 0.08 (1.2)	5.0 ± 0.11 (1.9)	5.2 ± 0.10 (2.0)
A/ADHBA	1.9 ± 0.13 (6.9)	1.8 ± 0.09 (5.3)	1.8 ± 0.09 (5.3)

Continuación Tabla 3

D A (250 pg)

	1er día	2o día	3er día
H	3.8 ± 0.05 (1.1)	3.4 ± 0.08 (2.5)	3.5 ± 0.16 (4.6)
H/DHBA	0.6 ± 0.02 (3.5)	0.7 ± 0.04 (5.7)	0.7 ± 0.06 (7.7)
A	2.3 ± 0.03 (1.1)	2.7 ± 0.07 (2.5)	2.8 ± 0.13 (4.7)
A/ADHBA	0.9 ± 0.04 (4.6)	1.0 ± 0.06 (5.6)	1.1 ± 0.12 (10.9)
(500 pg)			
H	5.6 ± 0.21 (3.7)	8.6 ± 0.10 (1.0)	8.9 ± 0.17 (1.9)
H/DHBA	1.1 ± 0.04 (4.0)	1.3 ± 0.07 (5.4)	1.3 ± 0.05 (4.0)
A	5.7 ± 0.10 (1.6)	5.7 ± 0.20 (3.5)	5.8 ± 0.11 (1.9)
A/ADHBA	1.9 ± 0.10 (5.6)	2.0 ± 0.15 (7.3)	2.0 ± 0.09 (4.7)

Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de las diferentes formas de medir los picos; entre paréntesis se muestra el coeficiente de variación para: altura (H), altura/altura del estándar interno (H/H(DHBA)), área (A) y área/área del estándar interno (A/A(DHBA)).

TABLA 4. COEFICIENTES DE VARIACION PARA LOS 3 DIAS

	NA		A		DA	
	250 pg	500 pg	250 pg	500 pg	250 pg	500 pg
H	13.9	9.5	6.0	13.1	6.6	23.4
H/HDHBA	6.5	10.8	7.8	6.6	6.4	5.6
A	2.0	4.5	9.1	6.2	10.2	1.0
A/ADHBA	3.9	2.6	11.7	2.6	9.2	3.4

Los valores representan los coeficientes de variación interensayo para los diferentes estándares en las concentraciones mencionadas.

Como puede observarse se encuentran en general coeficientes de variación menores para los valores absolutos, tanto de área como de altura, que para los valores corregidos por el estándar interno (tabla 3). Esto probablemente se deba a que la medición es manual y al referir los valores al estándar interno (DHBA) se suma el error de las dos mediciones. Sin embargo si se toman en cuenta los coeficientes de variación obtenidos para las medias de los diferentes días (tabla 4) en general los valores menores se obtienen para la relaciones área corregida por el área del DHBA y altura corregida por la altura del DHBA; no encontrando diferencias significativas entre las varianzas calculadas a partir de una u otra formas de medir los picos cromatográficos. Por esta razón y puesto que es más sencillo medir altura que área, en adelante se utilizará la relación altura del pico cromatográfico dividida por la altura del DHBA. Cabe señalar que se utilizó un inyector con capacidad de 2 ml, por lo que el error en la inyección juega un papel importante.

6.2.5) Cantidad mínima detectable.

Se inyectaron en orden decreciente mezclas de 125, 100, 75, 50, 25 y 12.5 pg de NA, A y DA, manteniendo constante la cantidad de DHBA (250 pg). Con 12.5 pg alcanza a medirse la altura del pico pero no su área.

La evaluación de la cantidad mínima detectable se realizó también con el detector LKB, obteniéndose en este caso un valor de 50 pg para una señal de 2 veces el ruido.

6.2.6) Curva de histéresis.

Se inyectaron en orden creciente y después en orden decreciente las siguientes cantidades: 0, 50, 100, 200, 350 y 500 pg de NA, A y DA, manteniendo constante la cantidad de DHBA (250 pg). En la figura 6 puede apreciarse que, aunque son muy pocos puntos, no se observa el fenómeno de histéresis, es decir, las curvas creciente y decreciente son una misma.

6.2.7) Eficiencia de la extracción con alúmina.

Se empleó la técnica descrita por Warner y col (1979) con algunas modificaciones: A 1.5 ml de estándar (simulando las concentraciones encontradas en el plasma) se le añaden 400 ul de una disolución amortiguadora de Tris/EDTA 1.5 M; pH 8.7 y 15 mg de alúmina. Se agita 15 min, se centrifuga 3 min (1500 X g, 4 °C). Se descarta el sobrenadante, la alúmina se lava 2 veces con un ml de agua y las catecolaminas se eluyen con 100 ul de una disolución que contiene: 75 ul de HClO₄ concentrado y 50 ul de EDTA al 5 % por cada 10 ml de disolución. Se inyectan 25 ul de sobrenadante en el cromatógrafo empleando las condiciones ya descritas.

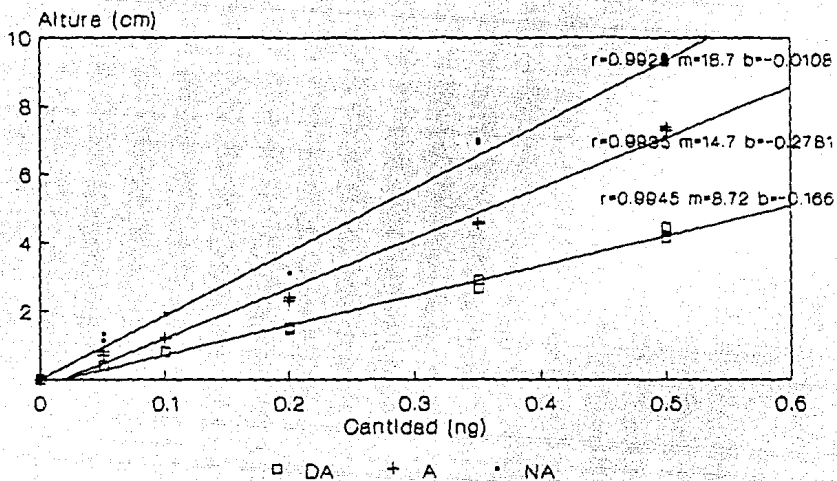


FIGURA 6. Altura del pico cromatográfico (H) vs cantidad inyectada. Se presentan las H obtenidas para diferentes cantidades inyectadas de NA, A y DA; así como las curvas de regresión lineal correspondientes. Columna: Novopack C18. Fase móvil: acetatos 0.1 M pH 4.5, EDTA 10 mM, OSS 0.1 mM. Detector BAS LC-2A,

Inicialmente se utilizó alúmina neutra Merck, pero el cromatograma del blanco de extracción mostraba una gran cantidad de picos no identificados. Se buscó cual de los reactivos empleados en la extracción resultaba responsable de estos picos, y se encontró que era la alúmina por lo que se procedió a darle un lavado ácido como lo señalan Anton y Saire (1969). Con este lavado ácido mejoró mucho el cromatograma del blanco.

Eficiencia de la extracción. Se procesaron por duplicado mezclas de 500 pg de NA, A y DA y 250 pg de DHBA en 1.5 ml de agua, los resultados se muestran en la tabla 5. Las recuperaciones son bajas, sin embargo son semejantes a las encontradas en la literatura (Anton & Saire, 1969).

Con el fin de verificar que la extracción de catecolaminas era completa, la alúmina, de la cual se habían ya eluido las catecolaminas, se sometió a una segunda extracción con 100 ul de la mezcla antes descrita y se inyectaron 25 ul en el cromatógrafo. En los tiempos de retención correspondientes a las catecolminas se observan señales muy pequeñas que prácticamente se confunden con el ruido, por lo que se decidió no aumentar el volumen de elución ni hacer una segunda extracción.

6.2.8) Control de calidad.

Con el fin de evaluar la variabilidad interensayo de la extracción con alúmina se hicieron cuatro curvas de calibración para NA y A. Estas curvas se presentan en las figuras 7 y 8. Se utilizaron cantidades entre 0.5 y 8 ng de NA y de A. Se graficó la altura del pico de NA o bien de A dividida entre la altura del pico de DHBA, cuya cantidad se mantuvo constante. En las gráficas se presenta el valor promedio junto con la desviación estándar, y la curva de regresión lineal para los promedios.

Las figuras 9 y 10 ilustran los datos obtenidos para experimentos semejantes pero utilizando el detector LKB.

Es importante señalar que con el detector LKB se obtienen dispersiones menores para las alturas corregidas y que para la A se amplía el intervalo de respuesta lineal. Cabe señalar que este es el comportamiento esperado si se comparan dos detectores, con electrodos de trabajo de pasta de carbono uno, y el otro de carbono vidriado. En la literatura se señala que el detector con electrodo de trabajo de pasta de carbono es más sensible que el que tiene carbono vidriado, pero su respuesta es más variable.

6.2.9) Adaptación de la Técnica.

A continuación se señalan las modificaciones necesarias para adaptar la técnica a los diversos proyectos de investigación.

TABLA 5. RECUPERACION DE LA EXTRACCION CON ALUMINA

	NA	A	DA	DHBA
% R	65.6	52.3	54.9	54.0

El porcentaje de recuperación (% R) se calcula comparando la altura de cada pico antes y después de la extracción.

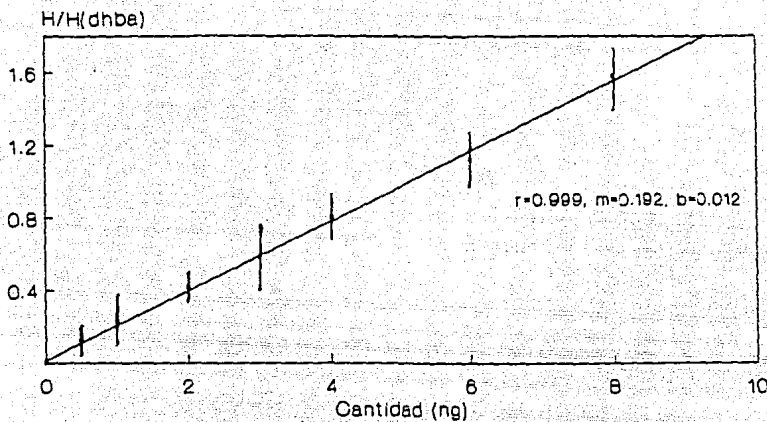


FIGURA 7. Curvas de calibración para NA, utilizando el detector BAS LC-2A. Se presentan los promedios y desviaciones estándar de las alturas corregidas, obtenidas para diferentes cantidades inyectadas de NA. También se presenta la curva de regresión lineal para los promedios. Condiciones cromatográficas: ver figura 6.

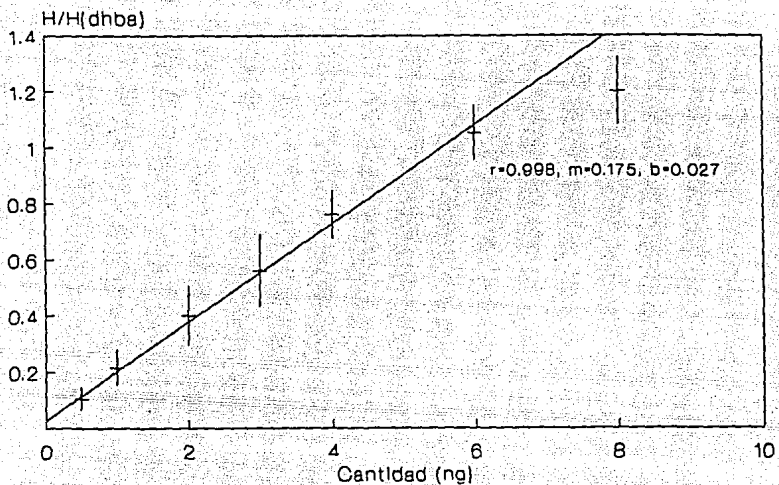


FIGURA 8. Curvas de calibración para A, utilizando el detector BAS LC-2A. Se presentan los promedios y desviaciones estándar de las alturas corregidas, obtenidas para diferentes cantidades inyectadas de A. También se presenta la curva de regresión lineal para los promedios sin tomar en cuenta el último punto (8 ng). Condiciones cromatográficas: ver figura 6.

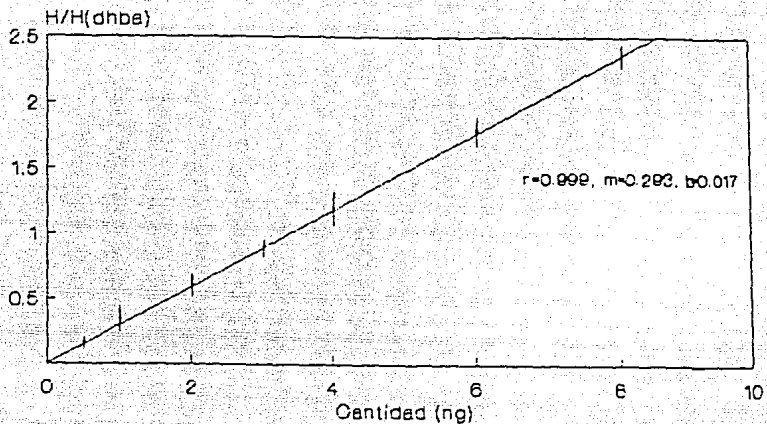


FIGURA 9. Curvas de calibración para NA, utilizando el detector LKB 2143. Se presentan los promedios y desviaciones estándar de las alturas corregidas, obtenidas para diferentes cantidades inyectadas de NA. También se presenta la curva de regresión lineal para los promedios. Condiciones cromatográficas: ver figura 6.

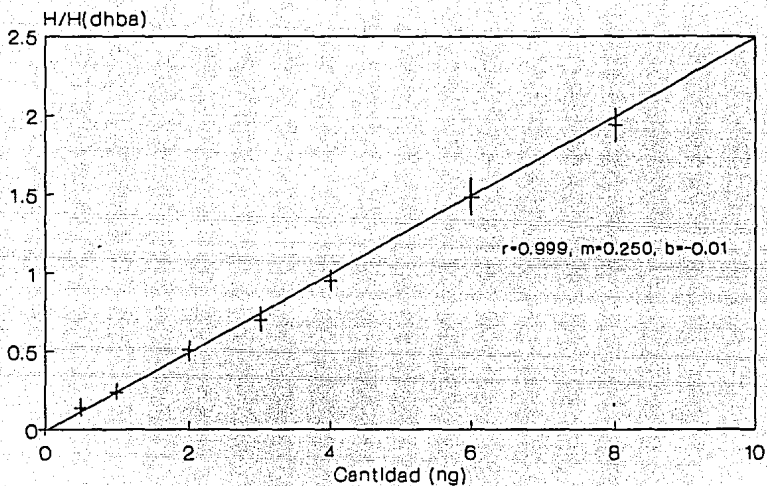


FIGURA 10. Curvas de calibración para A, utilizando el detector LKB 2143. Se presentan los promedios y desviaciones estándar de las alturas corregidas, obtenidas para diferentes cantidades inyectadas de A. También se presenta la curva de regresión lineal para los promedios. Condiciones cromatográficas: ver figura 6.

6.2.9.1) Excreción urinaria de MHPG en sujetos sometidos a privación de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR).

Cada orina de 24 horas se recolectó en un frasco que contenía 500 mg de metabisulfito de sodio (utilizado como antioxidante), se midió su volumen total y se guardó una alícuota para cuantificar MHPG y creatinina (la cantidad de creatinina excretada en 24 hs se utilizó como indicador de una adecuada recolección). Las determinaciones de MHPG se llevaron a cabo utilizando cromatografía de gases y detector de captura de electrones, metodología previamente estandarizada (Navarro y cols., 1983). La creatinina se cuantificó utilizando un método colorimétrico.

Los resultados dieron lugar a una publicación en una revista internacional (se anexan fotocopias)

6.2.9.2) Monodesdodación organo-específica de tironinas y actividad simpático-suprarrenal.

Este fue el primer proyecto que se trabajó con la técnica de HPLC-detección electroquímica descrita, las curvas de calibración que se mencionan en el inciso 6.1.8 fueron hechas para las concentraciones plasmáticas encontradas en estos animales experimentales.

Se tomaron 300 μ l de plasma a los que se les añadió DHBA y se sometieron a la extracción con alúmina. Cada ensayo consistía de una curva de calibración, una muestra de plasma patrón y 10 ó 15 muestras problema. Tanto los estándares como las muestras se procesaron por duplicado.

Los resultados han dado lugar a 3 presentaciones en congresos nacionales y a una publicación en una revista periódica internacional (Se anexan fotocopias).

6.2.9.3) Metabolismo y biotransformación periférica de tironinas en ratas lactando bajo diferentes niveles energéticos (dietas).

En este caso los niveles plasmáticos encontrados resultaron un poco menores a los obtenidos en el inciso anterior, por lo que se decidió incrementar el volumen de la alícuota a 500 μ l. Al igual que en el inciso anterior, para cada ensayo se utilizó una curva de calibración y un plasma control. Tanto las muestras como los estándares se trabajaron por duplicado.

Los resultados se presentaron en un congreso nacional y en uno internacional (se anexa fotocopia de los resúmenes).

6.2.9.4) Cuantificación de catecolaminas y algunos de sus metabolitos en líquido cefalorraquídeo de rata.

En este caso se pretendía en una misma corrida

cromatográfica separar a las catecolaminas y a sus metabolitos. Para este tipo de separaciones, en general se emplea como fase móvil una disolución amortiguadora con pH entre 3 y 4, con concentraciones elevadas de contraión y de algún disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo. En el detector que se estaba empleando en ese momento (BAS, mod. LC-2A), el electrodo de trabajo era de pasta de carbono y la superficie se modifica muy rápidamente con concentraciones elevadas de contraión o de algún disolvente orgánico; por lo que no se podían utilizar estas opciones. Sin embargo fue posible separar y detectar NA, DA, DHBA, MHPG, 5-HIAA, DOPAC y HVA.

En la literatura se señala que es posible determinar a las catecolaminas y a sus metabolitos a partir de líquido cefalorraquídeo precipitando proteínas con HClO_4 0.2 a 0.5 M centrifugando e inyectando el sobrenadante en el cromatógrafo (Warnhoff, 1984). La sola inyección de HClO_4 daba señales en el cromatógrafo que interferían con la determinación, y lo mismo ocurrió para concentraciones altas de otros ácidos, incluso para ac. acético grado HPLC.

Resultaba necesario utilizar un paso de purificación de la muestra previo a su introducción en el sistema cromatográfico. La adsorción en alúmina, que ya se había utilizado, no era factible, ya que sólo las aminas y el DOPAC se podían purificar en esta forma. Se optó por una extracción en medio ácido con acetato de etilo, evaporar este, redissolver en fase móvil e introducir la muestra en el sistema cromatográfico. Sin embargo con esta estrategia sólo es posible determinar los metabolitos ácidos y al MHPG.

6.2.9.5) Cuantificación de catecolaminas en algunos núcleos de tallo cerebral de ratas desnutridas.

En este caso se cuantificaron NA, A, DA y 5-HT. Fue necesario modificar las concentraciones utilizadas para las curvas de calibración, así como el procedimiento de purificación.

Se utilizó la técnica descrita por Semba y col (1984) con modificaciones. El tejido se homogeneizó en 100 μl de una mezcla de 1.3 ml de HClO_4 0.4 M, 1 ml de EDTA 0.1 M, 0.75 ml de agua y 30 μl de una disolución de DHBA en concentración de 10 ng/ml. Se centrifugó a 1500 g, 4 °C por 10 min, el sobrenadante se filtró a través de membranas de 0.22 μm de tamaño de poro y se inyectó en el cromatógrafo de líquidos. El precipitado se redisolvió en 100 μl de NaOH 0.1 M para determinación de proteínas (Lowry y col, 1951).

En la figuras 11 y 12 se presentan las curvas de calibración obtenidas para los estándares acuosos y añadidos a tejido de NA y DA respectivamente. Nótese que el tejido contenía cantidades apreciables de NA, pero no de DA. En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para cantidades crecientes de tejido.

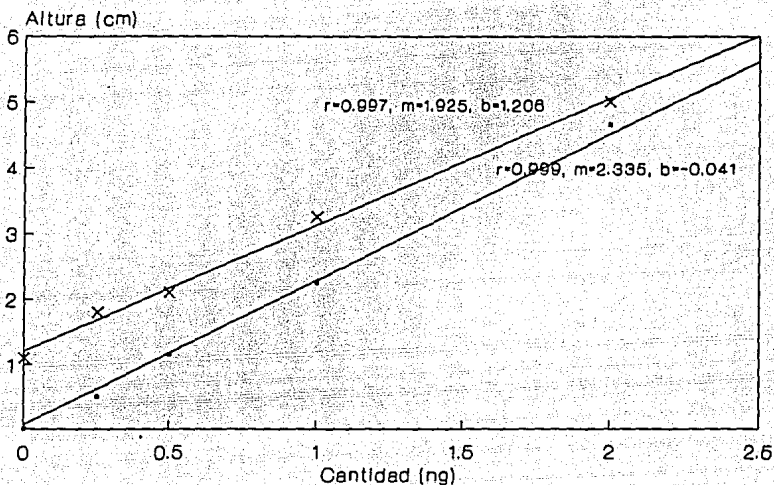


FIGURA 11. NA añadida a tejido. Se presentan las alturas obtenidas para diferentes cantidades de NA acuosa (.) y añadida a tejido (x). Así como las curvas de regresión obtenidas. Condiciones cromatográficas: ver figura 6. Detector LKB 2143.

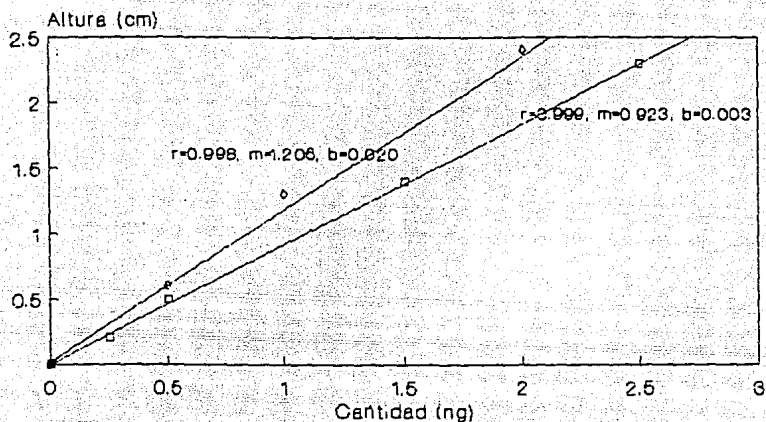


FIGURA 12. DA añadida a tejido. Se presentan las alturas obtenidas para diferentes cantidades de DA acuosa (◻) y añadida a tejido (◊). Así como las curvas de regresión obtenidas. Condiciones cromatográficas: ver figura 6. Detector LKB 2143.

TABLA 6. CANTIDADES DE LAS DIVERSAS AMINAS EN NUCLEOS DEL TALLO CEREBRAL DE RATA.

	No. de animales	NA (ng)	DA (ng)	5-HT (ng)	Proteinas (mg)
	1	1.6	0.4	5.6	0.51
NSQ	1	1.6	-	2.3	0.54
	2	5.1	0.6	8.6	1.07
	1	0.3	-	3.1	0.14
NRD	2	2.4	1.1	17.8	0.72
	3	2.0	0.6	18.3	0.98
	1	0.4	0.3	6.5	0.59
NLC	2	2.0	0.4	6.6	0.61

NSQ, núcleo supraquiasmático; NRD, núcleo raphe dorsalis; NLC, núcleo locus coeruleus.

Puede apreciarse que utilizando el extracto proveniente de 2 animales se pueden detectar las 3 aminas en los núcleos referidos.

6.2.9.6) Cuantificación de catecolaminas circulantes y hepáticas en ratas bajo diferentes condiciones de alimentación.

En este caso tanto la sangre como el hígado se pesan, se les adiciona ac. tricloroacético al 10 % para precipitar proteínas, se centrifugan, y el sobrenadante es sometido a la extracción con alúmina; ésta se lava con agua y posteriormente las catecolaminas se eluyen con ac. acético 0.2 N.

Se realizaron pruebas de linealidad, sensibilidad, recuperación y variación tanto intraensayo como interensayo. Estos datos se muestran en la tesis de maestría de I. Racotta (Racotta, 1991).

Este trabajo ha dado lugar a una presentación en un congreso nacional y a una publicación en una revista internacional (se anexan fotocopias).

6.2.9.7) Caracterización de diferentes subpoblaciones de gránulos cromafines en glándula suprarrenal de bovino.

Para estas determinaciones se modificaron las concentraciones de los estándares. En este caso se utilizan concentraciones entre 3.25 y 25 ng por 5 ul. Para cada grupo de muestras se corre en paralelo una curva de calibración por duplicado.

Los resultados han dado lugar a 3 presentaciones en congresos nacionales y a una en un congreso internacional (se anexan fotocopias de los resúmenes).

6.3. Estandarización de la técnica para medir THO.

6.3.1) Separación cromatográfica de DOPA y de α Me-DOPA.

En las condiciones descritas para la separación de NA, A, DHBA y DA, descritas en el punto 6.1.5, DOPA y α Me-DOPA (estándar interno), interferían con NA y DHBA por lo que se modificó la fase móvil, cambiando pH (a 3.5) y la concentración de octil sulfato de sodio (32.5 mg/l) para lograr la separación deseada.

6.3.3) Curvas de calibración de DOPA y α Me-DOPA.

En las condiciones descritas anteriormente se inyectaron estándares acuosos de DOPA y α Me-DOPA en cantidades de 1 a 20 ng de c/u. Ver figura 13.

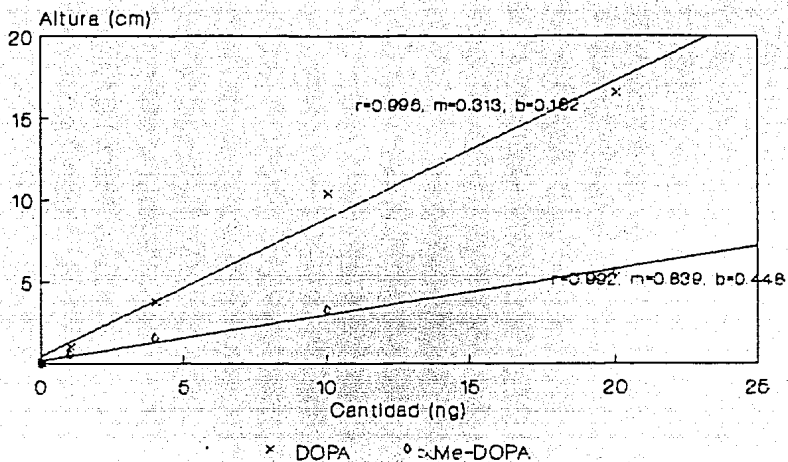


FIGURA 13. Curvas de calibración para DOPA y para α Me-DOPA. Se presentan las H obtenidas para diferentes cantidades inyectadas de DOPA y de α Me-DOPA; así como las curvas de regresión lineal obtenidas. Columna: Novapack C18. Fase móvil: acetatos 0.1 M pH 3.5, EDTA 10 mM, OSS 0.22 mM. Detector BAS LC-2A.

6.3.4) Empleo de columnas de sephadex G-10.

Con el fin de purificar la muestra antes de su introducción al sistema cromatográfico en la literatura se recomienda el empleo de columnas de intercambio catiónico (Nagatsu T. y col, 1979) o bien de filtración en gel (Westwernick B.H.C. y Mulder T.B.A, 1981). Debido a la disponibilidad de materiales, se decidió emplear la filtración en gel. Se utilizaron columnas de 0.5 X 6 cm. El sephadex G-10 se dejó hinchándose en ac. fórmico 0.01 M aproximadamente 12 hs., y se empacaron las columnas vaciando el sephadex hinchado por medio de una pipeta pasteur. Se aplicaron 20 ng de los siguientes estándares: A, NA, DHBA, DA, DOPA y α Me-DOPA. Se pasaron a través de la columna 3.5 ml de ac. fórmico 0.01 M y 1.5 ml de fosfato monobásico de sodio 5 mM. Se recolectaron fracciones de 0.5 ml a la salida de la columnas y se inyectaron 200 ul de cada fracción en el cromatógrafo. Los resultados se muestran en la figura 14.

6.3.5) Extracción con alúmina.

Como puede observarse en la figura 14 la DOPA y α Me-DOPA eluyen en las fracciones 5 a 9, en un volumen de 2.5 ml, por lo que es necesario concentrarlas, con este fin se utilizó una extracción en alúmina, semejante a la descrita en el punto 6.2.7 con las siguientes modificaciones: 20 mg de alúmina y 1 ml de disolución amortiguadora Tris/EDTA 1.5 M, pH 8.7.

6.3.6) Curvas de calibración para DOPA y α Me-DOPA empleando homogenado de cerebro de rata como vehiculo.

Se obtuvieron los cerebros de ratas macho adultos de aproximadamente 200 g de peso sacrificadas por decapitación. Inmediatamente después de su obtención los cerebros fueron pesados y homogeneizados en una disolución de sacarosa 0.3 M, en una relación 1 g de tejido/10 ml de disolución, mantenida a 4°C. Se tomaron alícuotas de 200 ul de este homogenado y se les añadieron estándares de DOPA y α Me-DOPA entre 1 y 20 ng, se agregaron 200 ul de HClO₄, 0.1 M, se agitaron y se centrifugaron a 1500 X g y 4°C. Los sobrenadantes se aplicaron a las columnas de sephadex G-10 y se sometieron a todo el procedimiento de extracción. Los resultados se muestran en la figura 15. Nótese que el tejido utilizado no contenía DOPA, por lo que las 3 curvas parten del origen.

Los pasos a seguir son (i) evaluar los coeficientes de variación intra e interensayo para la cuantificación de DOPA; (ii) hacer el ensayo enzimático utilizando homogenados de cerebro y de glándula suprarrenal como fuentes de THO y tirosina como sustrato. Se utilizará la técnica descrita por Nagatsu y col (1979). (iii) Evaluar coeficientes de variación del ensayo enzimático.

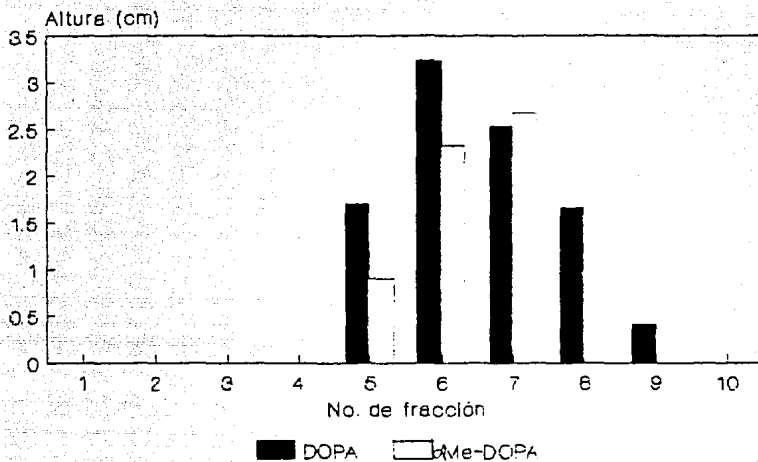


FIGURA 14. Perfil de elución a través de Sephadex G-10. Se presentan las alturas obtenidas para DOPA y α Me-DOPA en las diferentes fracciones eluidas de una columna empacada con Sephadex G-25 (0.5 x 6 cm). Fracciones de 0.5 ml. Vol de inyección: 200 ul. Condiciones cromatográficas: ver figura 13.

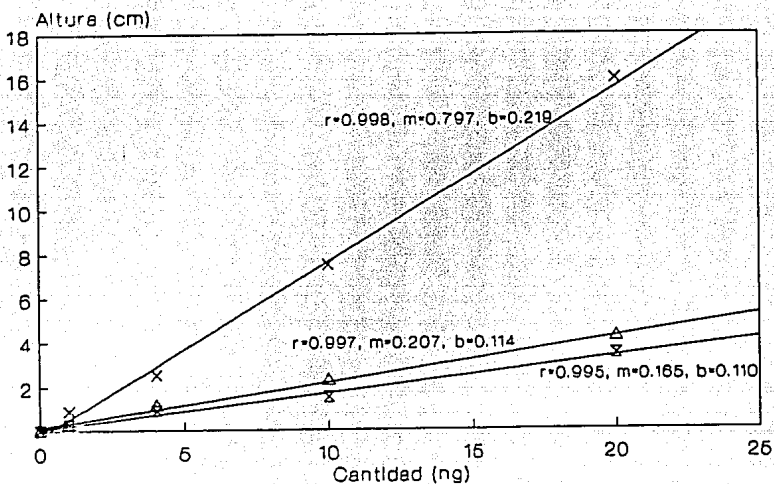


FIGURA 15. DOPA añadida a tejido. Se presentan las alturas obtenidas para diferentes cantidades de DOPA acuosa (x), acuosa y procesada (Δ) y añadida a tejido y procesada (X). Así como las curvas de regresión obtenidas. Condiciones cromatográficas: ver figura 13.

6.4) Separación de hormonas tiroideas empleando cromatografía en capa fina.

El tejido se homogeneizó y se sometió a extracciones a diferentes pH's con el fin de lograr una mejor recuperación de las posibles moléculas orgánicas yodadas (las que se suponen semejantes a tiroxina o a triyodotironina). Esta técnica es una modificación de la reportada por Gordon (1982).

Una alicuota de la extracción final se sometió a cromatografía en capa fina, o en papel. Este trabajo se presentó en dos congresos nacionales (se anexan fotocopias de los resúmenes).

6.5) Cuantificación de amitriptilina y nortriptilina en suero.

Se anexa fotocopia del trabajo publicado.

7) CONCLUSIONES.

- Se tiene una técnica sensible, específica y reproducible para la determinación de catecolaminas en diversos fluidos y tejidos biológicos; así como para algunos de sus metabolitos.

- La implementación de la técnica para cuantificar la enzima limitante de la biosíntesis de las catecolaminas, la tirosina hidroxilasa, está también por concluir.

- Así mismo se cuenta con una metodología para la separación de hormonas tiroideas y de algunos de sus productos metabólicos.

- También se cuenta con una técnica simple para la determinación de amitriptilina y nortriptilina en plasma.

- Y quizás la conclusión más importante sería que el esfuerzo coordinado de personas dedicadas a diversas áreas como son la fisiología y la química analítica puede rendir frutos valiosos.

7. BIBLIOGRAFIA.

Abe K. & Konaka R., Specific determination of 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol in urine by liquid chromatography with post-column reaction., *Clin Chem* 34: 87, 1988.

Aceves C., Ruiz-J. A., Romero C. & Valverde-R.C., Homeorhesis during early lactation. Euthyroid sick-like syndrome in lactating cows. *Acta Endocrinol (Copenh)* 110: 505, 1985.

Aceves C., Romero C., Sahagun L. & Valverde-R. C., Thyroid hormone profile in dairy cattle acclimated to cold or hot environmental temperatures. *Acta Endocrinol (Copenh)* 114: 201, 1987.

Aceves C. y Valverde-R. C., Lactación, homeorresis y hormonas tiroideas., *Veterinaria (Mex)* 18: 215, 1987.

Aceves C., Martinez Barranco T. y Valverde-R. C., Aspectos neuroendócrinos y metabólicos de la lactación y hormonas tiroideas. En: Domínguez-Casala (ed). *Tópicos selectos en Biología de la Reproducción R. UNAM-Miguel Angel Porua, 1991 (En prensa)*.

Andersen G.M., Young J.G., Jatlow P.J. & Coehn D.J., Urinary free catecholamines determined by liquid chromatography-fluorometry., *Clin Chem* 27:2060, 1981.

Andersen G.M., Feibel F.C. & Cohen D.J., Liquid chromatographic determination of vanillylmandelic acid in urine., *Clin Chem* 31: 819, 1985.

Anton A.H. & Sayre D.F., A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines., *J Pharmacol Exp Ther* 138: 360, 1962.

BAS Application Note No. 14., Plasma Catecholamines. LCEC Note No. 14. Bioanalytical Systems INC.

Brenneman A.R. & Kaufman S., The role of tetrahydropteridine in the enzymatic conversion of tyrosine to 3,4-dihydroxyphenyl alanine., *Biochem Biophys Res Commun* 17:177, 1964.

Canon W.B., *La sabiduría del cuerpo*. Ed. Séneca, México, 1941.

Chopra I.J. A radioimmunoassay for measurement of thyroxine in unextracted serum. *J Clin Endocrin Metab* 34: 938, 1972.

Chopra I.J., Solomon D.H., Chopra U., Yung W.S., Fisher D.A. & Nakamura Y., Pathways of metabolism of thyroid hormones., *Rec Progr Horm Res* 34: 521, 1978.

- Cooper J.R., Bloom F.E. & Roth R.H., *The Biochemical Basis of Neuropharmacology* 5th ed., Oxford University Press, 1986.
- Coyle J.T. & Henry D., Catecholamines in fetal and newborn rat brain., *J Neurochem* 21:61, 1973.
- Danforth E. Jr & Burger A.G., The impact of nutrition on thyroid hormone physiology and action. *Annu Rev Nutr* 9: 201, 1989.
- Del Rey M. E., Estudio de los parámetros que afectan la retención en cromatografía por pares de iones., Tesis de Maestría en Ciencias (Química Analítica). Fac. de Química, UNAM. México, 1989.
- DeQuattro V. & Campese V.M., Functional components of the sympathetic nervous system: regulation of organ systems. In: L.J. DeGroot, G.F. Cahill Jr., W. D. Odell, L. Martini, J. T. Potts Jr., D.H. Nelson, E. Steinberger & A. I. Winegrad (eds). *Endocrinology* Vol 2., Grune & Stratton, N.Y., 1979.
- Dodd P.R., Hardy J.A., Oakley A.E., Edwarson J.A., Perry E.K. & Delaunoy J.P., A rapid method for preparing synaptosomes: comparison with alternative procedures., *Brain Res* 226: 107, 1981.
- Drucker-Colin R. & Valverde-R. C., Endocrine and peptidergic functions during the sleep waking cycle. In: D. Ganten & D. Pfaff (eds) *Current Topics in Neuroendocrinology. Sleep and the Autonomic Nervous System.* Springer-Verlang, 1981.
- Einsenhofer G., Goldstein D.S. Stull R., Keiser H.R. Sunderland T., Murphy D.L. & Kopin I.J., Simultaneous liquid-chromatographic determination of 3,4-dihydroxyphenylglycol, catecholamines and 3,4-dihydroxyphenylalanine in plasma and their responses to inhibition of monoamine oxidase., *Clin Chem* 32: 2030, 1986.
- Engelman K, Portnoy B. & Lovenberg W., A single and sensitive double-isotope derivative method for the determination of catecholamines in biological specimens., *Am J Med Sci* 255: 259, 1968.
- Engler D. & Burger A.G., The deiodination of iodothyronines and their derivatives in man., *Endocr Rev* 5: 151, 1984.
- Falke H.E., Punt R. & Birkenhager W.H., Radioenzymatic estimation of noradrenaline in small plasma samples without prior extraction., *Clin Chim Acta* 89: 111, 1978.
- Fekete M.I.K., Kanyicska B. & Herman J.P., Simultaneous radioenzymatic assay of catecholamines and dihydroxy-phenylacetic acid /DOPAC/, comparison of the effects of drugs on tuberoinfundibular and striatal dopamine metabolism and on plasma prolactin level., *Life Sci* 23:1549, 1978.

Flood J.G., Granger M. & McComb R.B., Urinary 3-methoxy-4-hydroxy mandelic acid as measured by liquid chromatography, with on-line post column reaction., Clin Chem 25: 1234, 1979.

Flood J.G. & McComb R.B., Urinary metanephrines as measured by liquid chromatography with an on line post-column reaction detector., Clin Chem 27: 1268, 1981.

Fregly M.J. Activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during exposure to cold., Pharmac Ther 41: 85, 1989.

Froehlich P.M. & Cunningham T.D., An HPLC fluorometric assay for L-DOPA, noradrenaline and dopamine., Anal Chim Acta 97: 357, 1978.

Gordon J.T., Crutchfield F.C., Jennigs A.S. & Dratman M.B., Preparation of lipid-free tissue extracts for chromatographic determination of thyroid hormones and metabolites., Arch Biochem Biophys 216: 407, 1982.

Gordon-Weeks P.R. Isolation of synaptosomes, growth cones and their subcellular components. In A.J. Turner & H.S. Bachelard (eds) Neurochemistry. A Practical Approach., IRL Press, Oxford, England, 1987.

Harris G.W., Central control of pituitary secretion. In: Handbook of Physiology. Section 1 Neurophysiology. Vol II., J. Field (ed.) American Physiology Society, Washington, D.C., 1960.

Hawley M.D., Tatawawadi S.V., Piekarski S. & Adams R.N., Electrochemical studies of the oxidation pathways of catecholamines., JACS 89: 447, 1967.

Henry D.P., Starman B.J., Johanson D.G. & Williams R.H., A sensitive radioenzymatic assay for norepinephrine in tissues and plasma., Life Sci 16: 375, 1975.

Hjemdahl M., Daleskog M. & Kahan T., Determination of plasma catecholamines by high performance liquid chromatography with electrochemical detection: comparison with a radioenzymatic method., Life Sci 25: 131, 1979.

Horvath C., Melander W. & Molnar I., Solvophobic interaction in liquid chromatography with non polar stationary phases., J Chromatogr 125: 129, 1976.

Imai K., Fluorometric assay of dopamine, norepinephrine and their 3-O-methyl metabolites by using fluorescamine., J. Chromatogr 105: 135, 1975.

Imai K., Tsukamoto M. & Tamara Z., High performance liquid chromatographic assay of rat-brain dopamine and norepinephrine., J Chromatogr 137: 357, 1977.

Iversen L.L. & Jarrot B., Modification of an enzyme radiochemical assay procedure for noradrenaline., *Biochem Pharmacol* 19: 1841, 1970.

Jackman G.P., Differential assay for urinary catecholamines by use of liquid chromatography with fluorescence detection., *Clin Chem* 27: 1202, 1981.

Jackman G.P., A simple method for the assay of urinary metanephrines using high performance liquid chromatography., *Clin Chim Acta* 120: 137, 1982.

Johnson G.A., Gren J.M. & Kupiecki R., Radioenzymatic assay of DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine)., *Clin Chem* 24: 1927, 1978.

Julien C., Rodriguez C., Cuisinaud G., Bernard N. & Sassard J., Measurement of urinary catecholamines and their catechol metabolites and precursor by liquid chromatography with column-switching and on-line fluorometric and electrochemical detection., *J Chromatogr* 344: 51, 1985.

Kagedal B. & Goldstein S.D., Catecholamines and their metabolites., *J Chromatogr* 429: 177, 1988.

Kaplan M.M., The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamo-pituitary function., *Neuroendocrinology* 38: 254, 1984.

Kaplan M.M., Regulatory influences on iodothyronine deiodination in animal tissues. In: G. Hennemann (ed). *Thyroid Hormone Metabolism*. Marcel Dekker, Inc. N.Y., 1986.

Karoum F., Cattabeni F., Costa E., Ruthven C.R.J. & Sandler M., Gas chromatographic assay of picomoles concentrations of biogenic amines., *Anal Biochem* 47: 550, 1972.

Kissinger P.T., Refshauge C., Dreiling R., & Adams R.N., An electrochemical detector for liquid chromatography with picogram sensitivity., *Anal Lett* 6: 465, 1973.

Kohrle J.B. & Hesch R.D., Metabolism of the Thyroid hormones. *Horm Res* 26: 58, 1987.

Kopin I.J. Catecholamine metabolism (and the biochemical assessment of sympathetic activity)., *Clinics Endocrinol Metab* 6: 525, 1977.

Koslow S.H., Cattabeni F. & Costa E., Norepinephrine and dopamine: assay by mass fragmentography in the picomole range., *Science* 176: 177, 1972.

Krstulovic A.M. & Powell A.M., Use of native fluorescence measurements and stopped-flow scanning technique in high performance liquid chromatography analysis of catecholamines and related compounds., *J Chromatogr* 171: 345, 1979.

Krstulovic A.M., Zakaria M., Lohse K. and Bertani-Dziedzic., Diagnosis of neural crest tumors by reversed-phase high-performance liquid chromatography., *J Chromatogr* 186: 733, 1979.

Lake C.R., Ziegler M.G. & Kopin I.J., Use of plasma norepinephrine for evaluation of sympathetic neuronal function in man *Life Sci* 18: 1315, 1976.

Leonard J.L. & Visser T.J., Biochemistry of the deiodination. In: G. Hennemann (ed). *Thyroid Hormone Metabolism*. Marcel Dekker. Inc. N.Y., 1986.

Lhuguenot J.C. & Maume B.F., Improvements in quantitative gas phase analysis of catecholamines in the picomole range by electron-capture detection and mass fragmentography of their pentafluorobenzylimine-trimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr Sci* 12: 411, 1974.

Losher W., Bohme G., Muller F. & Pagliusi S., Improved methods for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain. Electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drugs effects on nerve terminal -aminobutyric acid in vivo., *J Neurochem* 45: 879, 1985.

Lowry O.H., Rosenbrough N.S., Farr A.C. & Randall R.J., Protein measurements with the folin-phenol reagent., *J Biol Chem* 193: 265, 1951.

Mefford I.N., Ota M., Stipetic M. & Singleton W., Application of a novel cation exchange reagent, igepon T-77 (N-methyl oleoyl taureate) to microbore separations of alumina extracts of catecholamines from cerebrospinal fluid, plasma, urine and brain tissue with amperometric detection., *J Chromatogr* 420: 241, 1987.

Meinhold H. Radioimmunoassay of iodothyronines. In: *Thyroid Hormone Metabolism*. G. Hennemann (ed) Marcel Dekker Inc. N.Y., 1986.

Mentasti E., Pelizzetti E. & Saini G., Reaction between Iron (III) and catechol (o-Dihydroxybenzene). Part II Equilibria and kinetics of the redox reaction in aqueous acid solution., *J Chem Soc, Dalton* 2609, 1973.

Minegishi A. & Ishisaki T., Rapid and simple method for the simultaneous determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 5-hydroxyindole-3-acetic acid and 4-hydroxy-3-methoxy phenylacetic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection., *J Chromatogr* 308: 55, 1984.

Mitsui A., Nohta H. & Ohkura Y., High performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent., *J Chromatogr* 344: 61, 1985.

Miyasaki H., Ishibashi M., Yamashita K. & Yakushiji M., Chem Pharm Bull 29: 796, 1981.

Molinoff P.B., Weinshilbom R. & Axelrod J., A sensitive enzymatic assay for dopamine- β -hydroxylase., J Pharmacol Exp Ther 178: 425, 1971.

Molnar J. & Horvath C., Reverse-phase chromatography of polar biological substances: separation of catechol compounds by high performance liquid chromatography., Clin Chem 22: 1497, 1976.

Monti J.M., Catecholamines and sleep-wake cycle: II. REM sleep. Life Sci 32: 1401, 1983.

Moreno A.J., Lopez R.S., Navarro A.L., Capella V.S., Garcia Reyes J.A. & Valverde-R. C., Excrecion urinaria de catecolaminas totales, adrenalina, noradrenalina, metanefrinas, acido homovanillico y vanillilmandelico en individuos normales. Rev Invest Clin (Mex) 35: 141, 1983

Mori K. & Imai K., Sensitive high-performance liquid chromatography system with fluorometric detection of three urinary catecholamines in the same range., Anal Biochem 146: 283, 1985.

Moyer T.P. & Jiang N., Optimized conditions for analysis of catecholamines by high-performance reversed-phase paired-ion chromatography with amperometric detection., J. Chromatogr. 153: 365, 1978.

Muskiet F.A.J., Fremouw-Ottevangers D.C., Wolthers B.G. & de Vries J.A., Gas-chromatographic profiling of urinary acidic and alcoholic catecholamine metabolites., Clin Chem 23: 863, 1977.

Muskiet F.A.J. & Groen A., Urinary excretion of conjugated homovanillic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and vanillic acid by persons on their usual diet and patients with neuroblastoma., Clin Chem 25: 1281, 1979.

Muskiet F.A.J., Thomason C.G., Gerding A.M., Fremouw-Ottevangers D.C., Nagel G.T. & Wolthers B.G. Determination of catecholamines and their 3-O-methylated metabolites in urine by mass fragmentography with use of deuterated internal standards., Clin Chem 25: 453, 1979.

Muskiet F.A.J., Stratingh M.C., Stob G.J. & Wolthers B.G., Simultaneous determination of the four major catecholamines metabolites and estimation of a serotonin metabolite in urine by capillary gas chromatography of their tert-butyldimethylsilyl derivatives Clin Chem 27: 223, 1981.

Nagatsu T., Regulation of catecholamines synthesis by tetrahydrobiopterin as cofactor of tyrosine hydroxylase., Progress in Catecholamine Res, Part A: Basic Aspects and Peripheral Mechanisms 41, 1988.

Nagatsu T., Oka K. & Kato T., Highly sensitive assay for tyrosine hydroxylase activity by high performance liquid chromatography., *J Chromatogr* 163: 247, 1979.

Nagatsu T. & Yamamoto T., Fluorescence assay of tyrosine hydroxylase activity in tissue homogenate., *Experientia* 24: 1183, 1968.

Navarro L., Moreno J., Valverde-R. C. & De la Fuente J.R., Cuantificación urinaria de 3-metoxi-4-hidroxifeniletiletilenglicol en sujetos sanos., *Rev Invest Clin (Mex)* 35: 149, 1983.

Natelson S., Lugovoy J.R., & Pincus J.B., A new fluorometric method for the determination of epinephrine., *Arch Biochem Biophys* 23:157, 1949.

Nedergard., Catecholamines: regulation, release and inactivation., *Pharmacol Toxicol* 63 (Suppl 1): 5, 1988.

Nelson L.M., Bubb F.A., Lax P.M., Weg M.W. & Sandler M., An improved method for the differential assay of 3-O-methylated catecholamines in human urine using ion-pair extraction and gas chromatography electron capture detection., *Clin Chim Acta* 92: 235, 1979.

Nohta H., Mitsui A. & Ohkura Y., Spectrofluorometric determination of catecholamines with 1,2-diphenyl ethylenediamine., *Anal Chim Acta* 165: 171, 1984.

Odink J., Sandman H. & Schreurs W.H.P., Determination of free and total catecholamines and salsolinol in urine by ion-pair reverse-phase liquid chromatography with electrochemical detection after a one-step sample clean up., *J Chromatogr* 377: 145, 1986.

O'hanlon J.F. Jr., A fluorometric assay for subnanogram concentrations of adrenaline and noradrenaline in plasma., *Anal Biochem* 34: 568, 1970.

Passon P.G. & Peuler J.D., A simplified radiometric assay for plasma norepinephrine and epinephrine., *Anal Biochem* 51: 618, 1973.

Persson B.A. & Karger B.L., High performance ion pair partition chromatography: the separation of biogenic amines and their metabolites., *J Chromatogr Sci* 12; 521, 1974.

Peuler J.D. & Johnson G.A., Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine., *Life Sci* 21: 625, 1977.

Philipp E., Assay for tyrosine hydroxylase in hypothalamic homogenates using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection., *J Chromatogr* 419: 27, 1987.

Picard M., Olichon D. & Gombert J., Determination of serotonin in

- plasma by liquid chromatography with electrochemical detection., J Chromatogr 341: 445, 1985.
- Ponzio F., Achilli G. & Algeri S., A rapid and simple method for the determination of picograms levels of 3-methoxytyramine in brain tissue using liquid chromatography with electrochemical detection., J Neurochem 36: 1361, 1981.
- Racotta I. Catecolaminas hepáticas: su posible participación en el control de la ingesta de alimento. Tesis de Maestría en Ciencias (Fisiología). ENCB, IPN, 1991.
- Rizzo V. & Melzi d'Eril G.V., Determination of free 3-methoxy-4-hydroxy phenylethylenglycol in plasma and in cerebrospinal fluid by liquid chromatography with coulometric detection., Clin Chem 33: 844, 1987.
- Robertson D., Heath E.C., Falkner F.C. Hill R.C., Brilis G.M. & Watson J.T. A selective and sensitive assay for urinary metanephrine and normetanephrine using gas chromatography mass spectrometry with selected ion monitoring., Biomed Mass Spectrom 5: 704, 1978.
- Ruiz-Primo E., Jurado J.L., Solis H., Maisterrena J.A., Fernández-Guardiola A. & Valverde-R. C., Polysomnographic effects on thyroid hormones in primary myxedema., Electroenceph Clin Neurophysiol 44: 559, 1982.
- Russek M. & Cabanac M., Regulación y Control en Biología. Un Nuevo Enfoque. C.E.C.S.A., México, 1983.
- Saelens J.K., Schoen M.S. & Kovacsics G.B., An enzyme assay for norepinephrine in brain tissue., Biochem Pharmacol 16: 1043, 1967.
- Saller C.F. & Zigmund M.J., A radioenzymatic assay for catecholamines and dihydroxyphenylacetic acid., Life Sci 23: 1117, 1978.
- Seki T., Yamaguchi Y., Noguchi K. & Yanagihara Y., Estimation of catecholamines by ion exchange chromatography on Asahipack ES-50LC, using glycyglycine as the post-derivatizing agent., J Chromatogr 332: 9, 1985.
- Semba J., Toru M. & Mataga N., Twenty four hour rhythm of norepinephrine and serotonin in nucleus supraopticus, raphe nuclei, and locus coeruleus in the rat., Sleep 7: 211, 1984.
- Sjoquist B. & Anggard E., Gas chromatographic determination of homovanillic acid in human cerebrospinal fluid by electron capture detection and by mass fragmentography with a deuterated internal standard., Anal Chem 44: 2297, 1972.

Solis H., Fernandez-Guardiola A. & Valverde-R. C.. Neuropharmacologic and neuroendocrine interrelations of human sleep.. In: R. Drocker-Colin, M. Skurovich, M.B. Sterman (eds). The Functions of Sleep, Academic Press, 1979.

Taylor J.T., Freeman S. & Brewer P., liquid chromatography of 3-methoxy 4'hydroxyphenylethylene glycol in urine with fluorescence detection., Clin Chem 27: 173, 1981.

Taylor R.B., Reid R., Kendle K.E., Geddes C. & Curle P.F.. Assay procedures for the determination of biogenic amines and their metabolites in rat hypothalamus using ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography., J Chromatogr 277: 101, 1983.

Thiede H.M. & Kehr W., Arch Pharmacol 318: 19, 1981.

Ueda E., Yoshida N., Nishimura K., Ioh T., Antoku S., Tsukada K., Granno S. & Kokubu T., A semiautomated measurement of urinary catecholamines using high-speed ion-exchange column chromatography., Clin Chim Acta 80: 447, 1977.

Valverde-R. C., Algunos conceptos y observaciones recientes sobre el control neurohumoral de la secrecion de prolactina en mamiferos., Rev Invest Clin (Mex) 25:267, 1973.

Valverde-R. C., Jurado J.L., Ruiz-J. A., Maisterrena J.A. & Fernandez Guardiola A., Hormones and sleep rhythmus in endocrine dysfunction. In: Valverde-R. C. & Arechiga H. (eds) Frontiers in Hormone Research Vol. 6, Karger, 1980.

Vera Avila L. E., Contribution a l'etude du mecanisme de retention en chromatographie de paires d'ions., These de doctorat de troisieme cycle. Specialite: Sciences physiques. Mention: Chimie analytique. Universite Pierre et Marie Curie, Paris. 1980.

Visser T.J. The role of glutathione in the enzymatic deiodination of thyroid hormones. In: J. Vina (Ed). Glutathione: Metabolism and Physiological Functions. CRC Press., 1990.

Vlachakis N.D., Alexander N., Velasques M.T. & Maronde R.F., A radioenzymatic microassay for simultaneous measurement of catecholamines and their deaminated metabolites., Biochem Med 22:323, 1979.

Vogel, G.W., Traub A.C. & Ben-Horin P., REM deprivation II: The effects on depressed patients. Arch Gen Psychiatry 18: 301, 1968.

Von Euler & U. Hamberg, Colorimetric determination of noradrenaline and adrenaline., Acta Physiol Scand., 19: 74, 1949.

Yellow R.S. & Berson S.A., Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods., Nature 184: 1948, 1959.

Yoshida A., Yoshida M., Sakai T. & Tamura J., Simple method for the determination of homovanillic and vanillylmandelic acid in urine by high performance liquid chromatography., J Chromatogr 227: 162, 1982.

Waddington C.H., Las ideas básicas de la biología. En: Hacia una Biología Teórica., C.H. Waddington (ed) Alianza, Madrid, 1976

Warnhoff M., Simultaneous determination of norepinephrine, dopamine, 5-hydroxytryptamine and their main metabolites in rat brain using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection., J Chromatogr 307, 271, 1984.

Waymire J.C., Bjur R. & Weiner N. Assay of tyrosine hydroxylase by coupled decarboxylation of dopa formed from 1-14C-L-tyrosine., Anal Biochem 43:588, 1971.

Weise V.K. & Kopin I.J., Assay of catecholamines in human plasma study of a single isotope radioenzymatic procedure., Life Sci 19:1673, 1976.

Westrnick B.H.C. & Mulder T.B.A., Determination of picomole amounts of dopamine, noradrenaline, 3,4-dihydroxyphenylalanine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindolacetic in nervous tissue after one-step purification on sephadex G-10, using high-performance liquid chromatography with a novel type of electrochemical detection., J Neurochem 36: 1449, 1981.

Zigmond R.E., Schwarzschild M.A. & Rittenhouse A.N., Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation., Ann Rev Neurosci 12: 415, 1989.

Changes in 24-Hour Urinary Excretion of MHPG After Four Continuous Nights of REM Sleep Deprivation in Human Volunteers

Rafael J. Salin-Pascual, Luz Navarro Angulo, and Juan Ramon de la Fuente

Received July 5, 1988; first revised version received November 16, 1988; second revised version received March 6, 1989; accepted June 3, 1989.

Abstract. Eight healthy volunteers were deprived of rapid eye movement (REM) sleep for 4 consecutive nights. Twenty-four-hour urine samples were collected to determine levels of 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylglycol (MHPG) during basal, REM sleep deprivation, and REM recovery conditions. A control experiment was carried out in four subjects who were awakened in non-REM sleep for 4 consecutive nights. Subjects deprived of REM sleep showed significant MHPG increases on night 4 of sleep deprivation. MHPG levels in the control condition decreased, but not significantly. When MHPG levels in both experimental and control conditions were compared in the same four subjects, a significant difference was observed, indicating an effect of the control condition. Increased MHPG levels were related to REM sleep reduction and to the time and number of awakenings. Our findings seem to support an inverse homeostatic relationship between norepinephrine metabolism and REM sleep.

Key Words. Sleep, catecholamines, norepinephrine, affective disorder.

The therapeutic effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation in patients suffering from endogenous depression have been widely reported, but the underlying neurobiological mechanisms remain unclear (Vogel et al., 1968). A role of brain norepinephrine (NE) in sleep regulation has been suggested (Monti, 1983). Pharmacological studies have shown a relationship between the functional state of NE receptors and REM sleep (Gaillard, 1983). The influence of β_1 -adrenergic receptors on REM sleep has been inferred from the fact that blockade of these receptors induced a dose-related decrease in REM sleep, and that the β_1 -adrenergic receptor agonists counteract this effect (Lanfumeijer et al., 1985). Mogilnicka et al. (1980) reported that 72 hours of REM sleep deprivation in rats produced a reduction of cortical β -adrenergic recognition sites, as assessed by dehydroalprenolol.

Preclinical and clinical research into the mechanisms of action of antidepressant agents has been focused on the adaptative changes in NE and serotonin receptors

Rafael J. Salin-Pascual, M.D., M.Sc., is Clinical Research Associate; Luz Navarro Angulo, M.Sc., is Preclinical Research Associate, and Juan Ramon de la Fuente, M.D., is Clinical Research Associate, Departamento de Psicobiología, División de Investigaciones Clínicas, Instituto Mexicano de Psiquiatría. Dr. Salin-Pascual is also in the Sección de Graduados, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional. (Reprint requests to Dr. R.J. Salin-Pascual, Departamento de Psicobiología, División de Investigaciones Clínicas, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calz. Mexico-Xochimilco 101, Mexico City 14370, Mexico.)

induced by long-term treatment (Charney et al., 1981; Racagni and Brunello, 1984). Long-term therapy decreases the sensitivity and density of brain β -adrenergic receptors.

Past studies have suggested that 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) or its sulfate conjugate is the major metabolite of brain NE (Maas et al., 1968), and that much of the NE originating in the brain is excreted in urine as MHPG. In contrast, relatively small amounts of urinary NE, normetanephrine, epinephrine, metanephrine, or 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid (VMA) seem to derive from the central nervous system (CNS) (Maas et al., 1979).

This report examines the relationship of 24-hour urinary excretion of MHPG in a group of human volunteers in two different sleep conditions: REM sleep deprivation and non-REM sleep awakening. The main issue to be addressed was whether selective REM sleep deprivation and non-REM sleep awakenings would alter CNS NE availability, as reflected in MHPG levels.

Methods

The subjects were eight normal volunteers (five females and three males) who ranged in age from 20 to 30 years (mean = 24.8, SD = 2.5 years old). All of them received medical interviews and were found to be in good health. They had no sleep disturbances and were not alcohol, drug, or tobacco abusers. All the volunteers received financial remuneration at the end of the study.

Urinary MHPG Collection. Twenty-four-hour urine samples were obtained from volunteers in the following conditions: baseline (2 days before the sleep procedures, because night 1 in the sleep laboratory would probably induce some anxiety); REM sleep deprivation; and REM recovery (followup nights) (see Table 1). Each urine sample was collected into a disposable glass container to which sodium metabisulfite had been added as a preservative. Once the total volume was measured, a 100-ml aliquot from each 24-hour sample was obtained. The aliquots were stored frozen (-20°C) until the MHPG and creatinine assays were carried out. The MHPG levels were determined in duplicate by gas chromatography with electron capture detection according to the method of Navarro et al. (1983). Creatinine levels were measured by automatic spectrophotometric procedures and were used to check the reliability of the urinary samples obtained. The 24-hour urinary samples were included in the study only if the amount of creatinine excretion exceeded 0.75 g, 24 hours.

REM Sleep Deprivation and Polysomnographic Recordings. Nine consecutive polysomnographic recordings were made for each subject as follows: 2 habituation nights, 1 baseline night, 4 REM sleep deprivation nights, and 2 REM recovery nights. The polysomnographic recordings were carried out using two channels for electroencephalographic (EEG) activity (leads C3-A2 and O1-A2). Two other channels were used for eye movement recordings, and one additional channel was used to record electromyographic activity. All the sleep recordings were scored in 30-sec epochs, following the standard criteria of Rechtschaffen and Kales (1968).

Sleep onset was defined as min 1 of 8 consecutive min of sleep without awakenings, after the lights had been turned off. REM sleep latency was defined as the period from sleep onset to the completion of two epochs of REM sleep (1 min). Sleep architecture was defined as the percentage of sleep time spent in Stages 1-4 and Stage REM.

After the habituation and baseline nights, subjects were REM sleep deprived for 4 nights. They were awakened after two REM sleep epochs and were kept awake for 3-5 min before being allowed to sleep again, in order to avoid their lapsing back into REM sleep. Recovery nights were carried out under the same conditions as baseline nights. All the recordings started at 2200h and finished at 0600h. The volunteers (college students) were encouraged to remain awake during the day and not to take daytime naps.

Control Condition. Four of the eight subjects who participated in the above experiment agreed to participate in another procedure 1 month later. In the control condition, the subjects were awakened in non-REM sleep for 4 consecutive nights. The MHPG collection schedule was as follows: baseline, non-REM sleep awakenings, and recovery. The sleep recordings were done as follows: 2 habituation nights, 1 baseline recording night, 4 nights of non-REM awakenings, and 1 recovery night. During nights of non-REM awakenings the subjects were allowed to start to sleep freely and to get into their first REM sleep periods, after which they were awakened and kept alert until 0200h; from 0200h to 0300h, they were allowed to sleep freely (during this period volunteers again went into REM sleep); from 0300h to 0500h, they were awakened again; thereafter they were allowed to sleep freely until 0600h (during this period they went into REM sleep once more). This procedure was followed to avoid indirectly depriving the subjects of REM sleep. The number of awakenings increased throughout the 4 nights; however, both the number of awakenings and the amount of time spent awake were less in the control condition than in the REM sleep deprivation condition.

Table 1. Procedures for REM sleep deprivation and non-REM sleep awakening experiments

Sleep condition		Urinary MHPG collection
REM sleep deprivation experiment (n = 8)		
Day 1		Basal sample
Day 2		Basal sample
Day 3	Habituation	
Day 4	Habituation	
Day 5	Basal recording	
Day 6	REM sleep deprivation	1st sleep deprivation sample
Day 7	REM sleep deprivation	2nd sleep deprivation sample
Day 8	REM sleep deprivation	3rd sleep deprivation sample
Day 9	REM sleep deprivation	4th sleep deprivation sample
Day 10	Followup	1st recovery sample
Day 11	Followup	2nd recovery sample
Non-REM sleep awakening experiment (n = 4)		
Day 1		Basal sample
Day 2	Awakenings	1st control sample
Day 3	Awakenings	2nd control sample
Day 4	Awakenings	3rd control sample
Day 5	Awakenings	4th control sample
Day 6	Followup	1st recovery sample

Note. REM = rapid eye movement MHPG = 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol

Results

Polysomnographic Changes. Table 2 shows the polysomnographic variables for the baseline night and the REM sleep deprivation nights. REM deprivation resulted in a reorganization of the sleep architecture, with a significant increase of Stage I and a tendency for REM sleep latency to be shortened.

Table 3 shows polysomnographic variables for the baseline and the 2 recovery nights. Sleep efficiency and minutes of REM sleep increased during the recovery nights, whereas the latency to the first REM sleep episode diminished. Table 4 shows

Table 2. Sleep variables during 4 nights of rapid eye movement sleep deprivation (REMSD) (mean \pm SD)

	Basal	1-REMSD	2-REMSD	3-REMSD	4-REMSD	F ¹	p ¹
Sleep continuity							
SL	20.1 \pm 10.7	9.6 \pm 7.1	8.8 \pm 8.0	12.9 \pm 11.1	10.6 \pm 11.5	1.79	0.15
#A	2.7 \pm 2.9	16.8 ² \pm 5.9	18.5 ² \pm 4.5 ²	19.5 ² \pm 6.8	19.1 ² \pm 5.7	17.99	0.000
TA	38.6 \pm 45.5	85.1 ² \pm 21.3	97.7 ² \pm 38.7	93.0 ² \pm 36.5	84.3 \pm 21.5	4.08	0.01
SEI	89.2 \pm 8.9	81.3 \pm 5.0	78.2 \pm 8.7	79.2 \pm 9.1	81.5 \pm 4.3	2.45	0.06
Sleep architecture							
S-I	14.5 \pm 16.0	35.1 ² \pm 11.2	34.8 ² \pm 12.7	35.3 \pm 10.6	42.7 ² \pm 23.3	6.27	0.001
S-II	201.2 \pm 36.5	193.3 \pm 42.9	167.4 \pm 50.2	195.5 \pm 37.1	184.7 \pm 19.4	0.9	0.5
S-III	30.4 \pm 23.3	24.3 \pm 7.7	31.4 \pm 27.0	20.4 \pm 4.5	22.2 \pm 8.1	0.6	0.6
S-IV	66.7 \pm 33.9	102.3 \pm 54.8	110.3 \pm 69.5	90.5 \pm 27.2	93.0 \pm 23.3	1.1	0.3
S-RE	111.4 \pm 23.6	27.9 ² \pm 27.9	29.05 ² \pm 11.1	40.5 ² \pm 20.4	36.3 ² \pm 15.5	31.3	0.000
REM sleep variables							
REM %	26.0 \pm 3.8	6.9 ² \pm 2.6	7.8 ² \pm 3.0	10.3 ² \pm 4.0	9.3 ² \pm 3.5	28.2	0.001
REM-L	87.7 \pm 27.5	84.5 \pm 29.0	59.8 ² \pm 13.4	85.8 \pm 31.4	65.8 \pm 14.6	2.09	0.1
#REM	4.2 \pm 1.0	15.2 ² \pm 6.1	18.5 ² \pm 5.6	16.7 ² \pm 5.8	17.6 ² \pm 3.9	11.7	0.001

Note. S.L. = sleep latency min; #A = number of awakenings; TA = time of awakenings min; SEI = sleep efficiency index %; S-I = Stage I min; S-II = Stage II min; S-III = Stage III min; S-IV = Stage IV min; S-RE = Stage REM min; REM % = REM sleep percentage; REM-L = REM sleep latency; #REM = number of REM episodes.

1. Analysis of variance, single factor design for repeated measures.

2. Student *t* test for repeated measures with Bonferroni correction at a level, $p < 0.01$

the number and total time of awakenings in the four volunteers who participated in both the experimental and control conditions. There is an important difference between the REM sleep deprivation and non-REM awakening conditions (two-way analysis of variance [ANOVA]: $F = 31.7$, $p < 0.0001$ for the time of awakenings; $F = 43.24$, $p < 0.000$ for the number of awakenings), but neither the effect along repeated nights nor the interaction is significant.

REM Sleep Deprivation and Changes in MHPG. All eight subjects completed the three experimental phases: baseline, REM sleep deprivation, and recovery. With one exception, the subjects showed increased MHPG levels throughout the REM sleep

Table 3. Sleep variables after 4 nights of rapid eye movement (REM) sleep deprivation: Basal and 2 followup nights (mean \pm SD)

	Basal	Followup 1	Followup 2	F ¹	p ¹
Sleep continuity					
S-L	20.1 \pm 10.7	10.8 \pm 3.7	10.6 \pm 8.1	2.7	0.1
*A	2.7 \pm 2.9	0.6 \pm 0.6	1.5 \pm 1.3	3.6	0.06
TA	38.6 \pm 45.5	10.5 \pm 8.8	10.1 \pm 7.1	2.9	0.08
SEI	89.2 \pm 9.7	96.7 \pm 1.4 ²	85.7 \pm 26.9	4.9	0.02
Sleep architecture					
S-I	14.3 \pm 16.5	7.3 \pm 4.8	12.2 \pm 8.6	0.8	0.5
S-II	201.2 \pm 36.5	176.6 \pm 42.7	174.3 \pm 67.3	1.03	0.3
S-III	30.4 \pm 23.3	34.4 \pm 12.9	33.4 \pm 11.8	0.7	0.5
S-IV	66.7 \pm 23.9	98.1 \pm 24.1 ²	87.6 \pm 45.9	3.18	0.07
S-RE	111.47 \pm 23.6	145.6 \pm 18.5 ²	145.6 \pm 23.7 ²	4.1	0.03
REM sleep variables					
REM %	26.1 \pm 3.8	30.9 \pm 3.4	31.2 \pm 4.9 ²	3.04	0.07
REM-L	87.1 \pm 27.5	61.9 \pm 19.7 ²	57.9 \pm 27.1 ²	4.8	0.1
#REM	4.2 \pm 1.0	4.8 \pm 0.7	5.3 \pm 1.3	2.6	0.1

Note: S-L = sleep latency (min); *A = number of awakenings; TA = time of awakenings (min); SEI = sleep efficiency index (%); S-I = Stage I (min); S-II = Stage II (min); S-III = Stage III (min); S-IV = Stage IV (min); S-RE = Stage REM (min); REM % = REM sleep percentage; REM-L = REM sleep latency; #REM = number of REM episodes

1. Analysis of variance, single factor design for repeated measures

2. Student *t* test for repeated measures with Bonferroni correction at a level $p < 0.01$

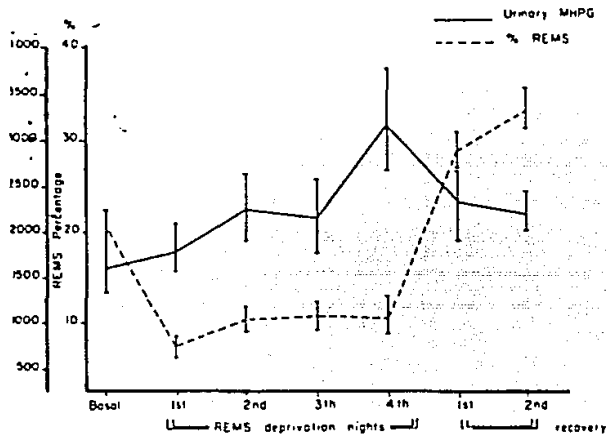
Table 4. Time and number of awakenings during rapid eye movement sleep deprivation (REMSD) and control condition in the same 4 healthy volunteers (mean \pm SD)

	Night 1	Night 2	Night 3	Night 4
Time of awakenings (min)				
REMSD	97 \pm 16.2	110.2 \pm 36.1	96.2 \pm 44.0	94.2 \pm 23.1
Control	46.3 \pm 17.1	35.6 \pm 2.5	41.0 \pm 11.5	55.2 \pm 32.3
2-way ANOVA				
	<i>F</i>		<i>P</i>	
Row effect	31.77		0.0001	
Col. effect	0.14		0.9	
Interaction:	0.38		0.7	
Number of awakenings				
REMSD	17.7 \pm 5.1	22.2 \pm 3.5	21.5 \pm 7.1	21.2 \pm 6.7
Control	8.0 \pm 1.8	13.5 \pm 3.6	10.7 \pm 1.5	8.7 \pm 2.7
2-way ANOVA				
	<i>F</i>		<i>P</i>	
Row effect	43.238		0.000	
Col. effect	1.74		0.2	
Interaction	0.23		0.8	

Note: ANOVA = analysis of variance.

deprivation nights (one-way ANOVA: $F = 5.22$, $p < 0.05$). However, a statistically significant difference was observed only for night 4 of REM sleep deprivation ($p < 0.05$, Student's t test for repeated measures). MHPG decreased in the recovery nights, but did not reach baseline levels. As Fig. 1 shows, there is an inverse relationship between the MHPG levels and the REM sleep percentage.

Fig. 1. Percentage of REM sleep and urinary MHPG (mg/24 hours): Basal, REM deprivation, and recovery

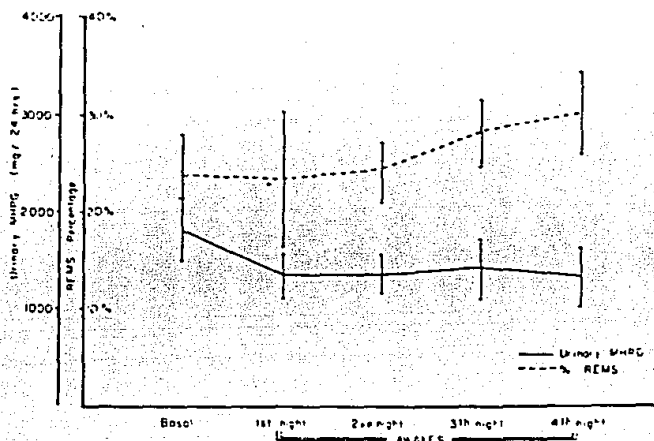


REM = rapid eye movement MHPG = 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol. After REM sleep deprivation, levels of MHPG increased, the effect became significant at day 4 of REM sleep deprivation, $p < 0.05$.

Non-REM Awakenings and MHPG Changes. Four of the eight subjects who took part in the REM sleep deprivation research also participated in the control experiment. These subjects were awakened during non-REM sleep, with an increasing frequency, but they did not remain awake as long as in the REM deprivation condition. Fig. 2 shows MHPG levels and REM sleep percentages for the control condition. Urinary MHPG levels decreased throughout the non-REM awakening nights, but not to a statistically significant degree. The non-REM sleep awakenings produced an increase in REM duration since the subjects were allowed to sleep freely in the hours in which REM activity most frequently appears. This is a relative increase since the REM sleep percentage was calculated as a function of the total sleep time. The total time spent in REM sleep throughout the 4 non-REM sleep awakening nights did not change significantly.

Table 5 presents a comparison of MHPG levels in the the four subjects who participated in both the REM deprivation and non-REM awakening conditions. A significant difference was observed between the two conditions (two-way ANOVA: $F = 17.4$, $p < 0.0004$), but neither the effect of repeated maneuvers nor the interaction was significant.

Fig. 2. Percentage of REM sleep and urinary MHPG (mg/24 hours): Control condition



REM = rapid eye movement MHPG = 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol. Levels of MHPG showed a tendency to decrease during the non-REM awakenings, but not to a statistically significant degree.

Table 5. MHPG during rapid eye movement sleep deprivation (REMSD) and control condition in the same 4 healthy volunteers (mean \pm SD)

Basal	Night 1	Night 2	Night 3	Night 4	Followup 1
REMSD					
1579.2	2018.5	2230.2	2275.7	3591.0	2676.5
\pm 219.1	\pm 816.9	\pm 1097.8	\pm 1132.2	\pm 1553.1	\pm 1309.5
Control					
1834.5	1378.7	1383.5	1420.0	1315.2	1237.7
\pm 426.3	\pm 243.2	\pm 224.9	\pm 370.2	\pm 307.5	\pm 61.1
2-way ANOVA		F	p		
Row effect		17.44	0.0004		
Col. effect		0.96	0.54		
Interaction		2.20	0.07		

Note. MHPG = 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol. ANOVA = analysis of variance.

Discussion

The results of the present study show that REM sleep deprivation leads to a significant increase in urinary MHPG excretion. However, it is difficult to ascertain that the reduction of REM sleep is the only factor involved in the increased MHPG levels, since the total time and number of awakenings in the REM sleep deprivation condition were higher than in the control condition. In our control condition, the total time

spent in REM sleep was unchanged. If the subjects had been awakened as frequently in the control condition as in the REM sleep deprivation condition, they might have been indirectly deprived of REM sleep.

The increase of urinary MHPG in the REM sleep deprivation condition and the decrease in the control condition seem to support Morgane and Stern's (1974) proposal of an inverse homeostatic relationship between NE metabolism and REM sleep total time. Some pharmacological evidence supports this hypothesis: Heterocyclic antidepressants and monoamine oxidase inhibitors are associated with a reduction in REM sleep. Drugs of these types lead to an increased availability of monoamines at the synaptic cleft (Cooper et al., 1984), whereas reserpine, which is associated with monoamine depletion, increases REM sleep in humans (Hartmann et al., 1978).

The fact that the MHPG increased significantly until night 4 of REM sleep deprivation night could reflect a threshold above which biological changes take place when this sleep phase is manipulated. In our laboratory, volunteers had been REM sleep deprived for 2, 4, and 6 consecutive nights (unpublished data); significant polysomnographic changes were observed only after night 4 of REM sleep deprivation, and were even more evident after night 6 of sleep deprivation. At the biochemical level, this could be correlated with MHPG concentration.

As mentioned above, REM sleep deprivation in rats is associated with a reduction in β_1 -adrenergic receptors in the cortex after 72 hours (Mogilnicka et al., 1980). If MHPG behaves similarly in rats as in humans beings, this reduction in β_1 -adrenergic receptors might be related to an increase in NE metabolism in the CNS.

REM sleep deprivation modified levels of urinary MHPG excretion, but it is probable that this sleep manipulation modified other neurotransmitter systems (serotonin, dopamine, and acetylcholine) as well (Santos and Carlini, 1983; Zwicker and Calil, 1986; Salin-Pascual et al., 1989). These modifications could underlie the observed antidepressant benefits derived from REM sleep deprivation.

The data in presented in Table 2 indicate that the sleep variables that show the greatest modification after sleep deprivation are those related to sleep continuity and REM sleep. During the recovery phase, there is an augmentation of sleep continuity which is accompanied by an increase in REM sleep, as has already been reported by Dement (1960).

Sleep Stage IV, which showed very little change during the REM sleep deprivation process, increased in the recovery night. This increase might reflect neurobiological events during delta sleep that enhance REM sleep mechanisms. It might also be related to the two-process hypothesis of Borbély (1982), which proposes a sleep-wake dependent process (Process "S") and a sleep-wake independent circadian process (Process "C").

Studies of REM sleep deprivation and recovery may lead to a better understanding of the function of REM sleep, as well as the possible antidepressant mechanisms involved in its manipulation.

References

- Borbély, A.A. A two-process model of sleep regulation. *Human Neurobiology*, 1:195-204, 1982.
- Charney, D.S.; Menkes, D.B.; and Heninger, G.R. Receptor sensitivity and the mechanism of action of antidepressants: Implication for etiology and therapy of depression. *Archives of General Psychiatry*, 38:1160-1181, 1981.
- Cooper, J.R.; Bloom, F.E.; and Roth, R.H. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. New York: Oxford University Press, 1982.
- Dement, W. The effect of dream deprivation. *Science*, 131:1705-1707, 1960.
- Gaillard, J.M. Biochemical pharmacology of paradoxical sleep. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 16:205S-230S, 1983.
- Hartmann, E. Effects of psychotropic drugs on sleep: The catecholamines and sleep. In: Lipton, M.A.; DiMascio, A.; and Killam, K.F., eds. *Psychopharmacology: A Generation of Progress*. New York: Raven Press, 1978.
- Lanfumeij, L.; Dugovic, C.; and Adrien, J. Beta-1 and beta-2 adrenergic receptors: Their role in the regulation of paradoxical sleep in the rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 60:558-567, 1985.
- Maas, J.W.; Haitox, S.E.; Greene, N.M.; and Landis, D.H. 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol production by human brain in vivo. *Science*, 205:1025-1027, 1979.
- Maas, J.W., and Landis, D.H. In vivo studies of metabolism of norepinephrine in central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 163:147-162, 1968.
- Mogilnicka, E.; Arbilla, S.; Depoorter, H.; and Langer, S.Z. Rapid-eye-movement sleep deprivation decreases the density of ³H-dihydroalprenolol and ³H-imipramine binding sites in the rat cerebral cortex. *European Journal of Pharmacology*, 65:289-292, 1980.
- Monti, J.M. Catecholamines and sleep-wake cycle: II. REM sleep. *Life Sciences*, 32:1401-1425, 1983.
- Morgane, P.J., and Stern, W.C. Chemical anatomy of brain circuits in relation to sleep and wakefulness. *Advances in Sleep Research*, 1:1-131, 1974.
- Navarro, L.M.; Moreno, J.; Valverde, C.; and de la Fuente, J.R. Cuantificación urinaria del 3-metoxi, 4-hidroxifeniletilenglicol en sujetos sanos. *La Revista de Investigación Clínica*, 35:149-154, 1983.
- Recagni, G., and Brunello, N. Transynaptic mechanism in the action of antidepressant drugs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 5:574-580, 1984.
- Rechtschaffen, A., and Kales, A. *A Manual of Standardized Terminology, Techniques and Scoring Systems for Sleep Stages of Human Subjects*. Los Angeles: Brain Information Service, UCLA Brain Research Institute, 1968.
- Salin-Pascual, R.J.; Nieto-Caraveo, A.; Roldan-Roldan, G.; Huerto-Delgado, L.; and Granados-Fuentes, D. Effects of physostigmine infusion in healthy volunteers deprived of rapid eye movement sleep. *Sleep*, 12:246-253, 1989.
- Santos, R., and Carlini, E.A. Serotonin receptor activation in rats previously deprived of REM sleep. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 18:501-507, 1983.
- Vogel, G.W., Traub, A.C., and Ben-Horin, P. REM deprivation II: The effects on depressed patients. *Archives of General Psychiatry*, 18:301-311, 1968.
- Zwicker, A.P., and Cahil, H.H. The effects of REM sleep deprivation on striatal dopamine receptor sites. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24:809-812, 1986.

Neuroendocrine Regulation of Adrenal 5'-Monodeiodination during Acute Cold Exposure in the Rat. I. Effects of Hypophysectomy

BRENDA ANGUIANO, CARMEN ACEVES, LUZ NAVARRO, ADELA RAMIREZ DEL ANGEL, MARICELA LUNA, GERARDO PERERA, AND CARLOS VALVERDE-R

Departamento de Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D. F.

ABSTRACT. Circulating levels of T_4 , T_3 , corticosterone, noradrenaline, and adrenaline, as well as 5'-monodeiodinase activity (5'-MA) were measured in control and hypophysectomized rats acutely exposed to cold environment (15–120 min, 4°C). In addition to the well known activation of the sympathoadrenomedullary system and the hypothalamic-pituitary-adrenal and thyroid axes, cold exposure was followed by a rapid and sustained increase of 5'-MA in the hypothalamus, and a biphasic course of activation in the adrenal gland in control rats. The adrenal rapid activation (30 min) corresponded to the medulla and the slower activation (120 min) to the cortex. Both, the basal adrenal 5'-MA and the response to cold in adrenal and hypothalamus

were 2-fold higher in hypophysectomized rats compared to control. The time course of enzyme activation in these structures suggests that: 1) organ-specific increases in 5'-MA may be associated to a simultaneous rise in their metabolic and/or functional activity, 2) the triggering mechanisms involves an immediate sympathetic signal activating the hypothalamic-adrenal medulla response and a pituitary signal eliciting a slower adrenocortical response, and 3) the compensatory sympathetic hyperactivity after panhypopituitarism contribute to enhance both the adrenal enzyme basal activity and the hypothalamic and adrenal hyperresponse to cold stress. (*Endocrinology* 128: 504–505, 1990)

THYROID hormones are necessary for survival and sustain the long-term increased metabolic demands associated to facultative nonshivering thermogenesis in cold-adapted homeotherms (1, 2). Thus, several parameters of thyroid function are increased during cold acclimation, including a significant elevation of both 5'-monodeiodinase-I (5'-MA-I) in the liver and the kidney which contributes to the largest proportion of circulating T_3 , as well as of type II 5'-MA (5'-MA-II) in brown adipose tissue (BAT) (2–5). Besides this activation of 5'-MA elicited by a systemic and sustained increase of energy metabolism, recent studies suggest the occurrence of organ-specific increases of 5'-MA and local T_3 neogenesis, which are intimately associated to the functional status and/or metabolic expenditure of each organ. Thus, 5'-MA-II exhibits a conspicuous nyctohemeral rhythm in rat pineal and cerebral cortex but not in BAT (6, 7). There is no 5'-MA-I rhythm in the liver, kidney and anterior pituitary gland (7). The presence of a 5'-MA-II

rhythm in the anterior pituitary is controversial (6, 7). Primary hypothyroidism increases anterior pituitary 5'-MA-II but abolishes its rhythmicity (7, 8). 5'-MA-I increases in the mammary gland (9) and decreases in liver (9, 10), kidney (10), and BAT (11) of lactating rats.

Although analyzed during cold adaption (2–5), organ specific 5'-MA has not been assessed in those neuroendocrine structures recognized as the primary effector systems involved in the acute response to cold stress. Therefore, the purpose of the present study was 2-fold: to analyze 5'-MA in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathoadrenomedullary system during acute cold exposure in the rat, and to start exploring a possible regulatory influence of the pituitary upon adrenal 5'-MA.

Materials and Methods

Reagents

Nonradioactive iodothyronines were obtained from Henning Co (Berlin, Germany), corticosterone (CTa), adrenaline (A), and noradrenaline (NA) from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). ^{125}I -Labeled thyronines and 1,2,6,7- $^3H(N)$ -hydrocortisone were purchased from New England Nuclear (Boston, MA). The specific activity of T_4 , T_3 , r T_3 , and CTa, were: 1250, 1200, 1174, and 220 ($\mu Ci/\mu g$), respectively. Dithiothreitol was obtained

Received August 6, 1990.

Address all correspondence and requests for reprints to: Carlos Valverde-R., Departamento de Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Apdo Postal 70-228, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México.

*This work was supported in part by Grant G101-7233 from PRDCyT, OEA/CoNaCyt.

from Calbiochem (La Jolla, CA), and Propyl-thiouracil (PTU) from U. S. Biochemical Corp (Cleveland, OH).

Animals

Two-month-old male Wistar rats, weighing 250-350 g were maintained (four to six per cage) in a temperature-controlled room (24 ± 1 C) with a constant lighting schedule (lights on, 0800-2000 h). All animals had free access to tap water and rat (Purina, México DF) laboratory chow.

Surgery

Hypophysectomy (Hpx) was performed using the parapharyngeal technique (12). Experiments were performed on the 10th day after surgery and only in animals whose body weight gain was less than 10%. Hypophysectomy was certified by visual examination after killing.

Experimental protocol

All procedures were conducted between 1030 and 1230 h. Experimental animals were transferred to a cold room (4 ± 1 C) and killed (four to six per group) after 15, 30, 60, or 120 min of exposure. Control animals were kept at 24 ± 1 C.

Blood and tissue collection and handling

Rats were killed by decapitation within 10 sec after removal from their cages. Trunk blood for determination of catecholamines was collected in heparinized plastic tubes placed in ice and the remainder was allowed to clot at room temperature. All samples were centrifuged at 4 C, and the plasma or serum stored at -20 C until hormones were measured. Brain, hypothalamus, pituitary, adrenal glands, and liver were rapidly dissected and frozen (acetone-dry ice).

Analytical procedures

Thyroxines. Circulating serum levels of T_4 and T_3 were measured by specific RIA methods as previously described (13). These RIAs have been adapted to rat by adding homologous hypothyroid serum to the standar curve. The lower limit of sensitivity was 0.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ and 12.2 ng/dl for T_4 and T_3 , respectively. The intra- and interassay coefficients of variation ($n =$ six to eight) were 8.6% and 10.5% for T_4 and 9.0% and 12.8% for T_3 . Each hormone was quantified in all samples within the same RIA.

CTa. Circulating serum levels of CTa were measured by a competitive protein binding assay as described elsewhere (14). The intra- and interassay coefficients of variation were 8.4% ($n = 5$) and 8.0% ($n = 10$), respectively.

Catecholamines. Plasma catecholamines were purified and concentrated by extraction with aluminum oxide and measured by HPLC using electrochemical detection. The method with minor modifications is similar to the one described by Hjendahl (15). Recoveries ranged from 55-65%. The minimum working detection limits for NA and A were 200 pg. The intra- and interassay coefficient of variation values were 8.3% ($n = 5$) and 13.0% ($n =$

10), respectively.

Enzymatic assay. 5'-MA was determined by a modification of the radiolabeled iodide-release method described by Leonard and Rosenberg (9, 16). Enzyme activity was measured by incubating tissue homogenates (1:10 wt/vol) at 37 C. The incubation mixture (100 μl) contained 2 nM [^{125}I]T $_3$ as well as 20 mM dithiothreitol. Assays in brain, hypothalamus, pituitary, and adrenal gland were performed incubating individual homogenates (300 to 500 μg protein) during 4 h. In the case of the liver (60 to 100 μg protein) the incubation time was 2 h. Only in those experiments in which 5'-MA was separately analyzed in the cortical and medullar component of the adrenal gland, pools of four to six dissected glands were used (300-500 μg protein). The deiodinative pathway in the adrenal gland was characterized by incubating homogenates of the whole gland with or without PTU (10 mM). Results of enzyme activity are expressed as femtomoles or picomoles per mg/protein \cdot h. Protein was measured by Bradford's method (17).

Data analysis and statistics. All results are expressed as the mean \pm SEM. Group comparisons were made by two-way analysis of variance and Fisher's Least Significant Difference test (18). Differences with a $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Hormone levels

Acute cold exposure in normal (NL) rats was accompanied by a significant rise in blood levels of NA, CTa, T_3 , and A (Table I). Circulating levels of NA and CTa reached a peak within the first 15 min of exposure to cold. However, whereas CTa remained elevated for up to 1 h, NA exhibited an acute and transient increase returning to basal values after 30 min. Blood concentrations of T_3 rose to a peak about 50% above control levels after 1 h of exposure to cold and remained elevated thereafter. There was a significant rise of A values 120 min after cold exposure. Hormone-resting levels of CTa and T_3 in Hpx animals were lower compared to NL rats. Hormone levels were not affected in Hpx animals during cold exposure, except for T_3 values which exhibited a significant decrease within the first 30 min. Basal circulating T_4 levels were similar in both intact and Hpx rats. These values remained unchanged during the entire study.

5'-MA activity

The results of 5'-MA in both NL and Hpx-animals are depicted in Fig. 1. No significant variations of enzyme activity were evident in the liver and brain (data not shown) as well as in the pituitary gland. In contrast, cold exposure stimulated 5'-MA in the rest of the tissues tested. In NL rats the activity of the enzyme in the hypothalamus rose from 210 to 380 within the first 15

TABLE 1. Effect of acute cold exposure on circulating levels of catecholamines, CTA, and thyronines in NL and Hpx rats

Exp 1 group	NA (ng/ml)	A (ng/ml)	Cta (ng/ml)	T ₃ (ng/dl)	T ₄ (μg/dl)
0 NL	2.8 ± 0.3 ^a	8.4 ± 1.0 ^a	271.8 ± 51.9 ^a	91.6 ± 8.2 ^a	3.5 ± 0.5 ^a
0 Hpx	2.9 ± 0.3 ^a	6.7 ± 1.5 ^a	142.0 ± 15.0 ^a	62.0 ± 8.4 ^a	2.8 ± 0.5 ^a
15 NL	4.5 ± 0.7 ^b	8.4 ± 1.2 ^a	466.0 ± 66.4 ^b	92.0 ± 4.9 ^a	3.2 ± 0.4 ^a
15 Hpx	3.9 ± 0.6 ^{a,b}	7.0 ± 1.1 ^a	144.0 ± 25.0 ^a	36.1 ± 8.4 ^{a,c}	3.0 ± 0.8 ^a
30 NL	4.3 ± 0.7 ^{a,b}	9.9 ± 1.8 ^a	311.9 ± 49.0 ^b	96.1 ± 23.8 ^a	3.7 ± 0.8 ^a
30 Hpx	4.1 ± 0.8 ^{a,b}	8.2 ± 2.5 ^a	149.0 ± 25.0 ^a	27.6 ± 11.9 ^a	3.3 ± 0.6 ^a
60 NL	4.4 ± 0.8 ^{a,b}	10.1 ± 1.9 ^a	356.0 ± 38.7 ^b	131.0 ± 5.2 ^d	3.8 ± 0.8 ^a
60 Hpx	3.4 ± 0.7 ^{a,b}	6.6 ± 0.8 ^a	224.0 ± 49.0 ^a	60.8 ± 11.0 ^d	3.3 ± 0.5 ^a
120 NL	3.5 ± 0.5 ^{a,b}	23.7 ± 5.5 ^b	288.0 ± 31.5 ^a	124.0 ± 7.8 ^d	4.0 ± 0.5 ^a
120 Hpx	3.6 ± 0.4 ^{a,b}	8.0 ± 1.2 ^a	354.0 ± 126.0 ^b	51.6 ± 2.8 ^{c,e}	3.0 ± 0.6 ^a

All values represent the mean ± SEM of six to eight animals per group. Means bearing different superscript letters (within or between groups) are significantly different, $P < 0.05$.

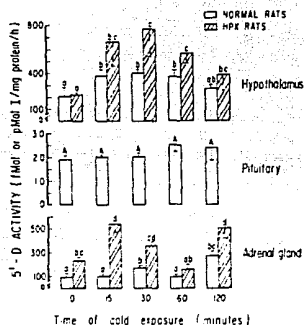


FIG. 1. Comparison of hypothalamic, pituitary, and adrenal gland 5'-MA responses to acute cold exposure in intact NL and Hpx rats. In this latter group notice the increased adrenal basal activity and the marked enzyme hyperresponse to cold exposure in the hypothalamus and the adrenal gland (further details in text). Results correspond to two separate experiments using three animals per point. Means bearing different superscript letters (within or between groups) differ significantly ($P < 0.05$). Hypothalamic and adrenal gland enzyme activity is expressed in femtomoles whereas in pituitary corresponds to picomoles l/mg/protein/h).

min of exposure and remained elevated for up to 1 h, returning to basal levels afterwards. In the adrenal gland the enzyme exhibited a biphasic pattern of activation that attained maximum values after 30 (170) and 120 min (270) of cold exposure.

5'-MA remained constant when whole adrenal glands from NL-rats were assayed with or without 10 mM PTU (84.0 ± 19.0 vs. 98.3 ± 14.7 , respectively). The differential response of 5'-MA in the adrenal cortex and medulla of cold exposed NL rats is summarized in Table 2. In two separate experiments, enzyme activity in the cortex consistently showed an important elevation at 120 min of cold exposure. In contrast, in the medulla 5'-MA only exhibited an acute and transient increase 30 min after

TABLE 2. Differential response of 5'-MA in the adrenal cortex and medulla of NL during cold exposure

	Control	15 min	30 min	60 min	120 min
Cortex					
Exp 1	190	250	210	170	700
Exp 2	195	195	195	90	310
Medulla					
Exp 1	65	53	140	55	64
Exp 2	104	96	240	85	106

Values represent enzyme activity (fmol/mg protein · h) from a pool of four to six glands each time.

exposure.

Hypophysectomy promoted a significant decrease (25%) in the wet weight of adrenal glands as well as increased basal levels of enzyme activity only in these glands (2 times higher than in NL). As shown in Fig. 1, hypophysectomy markedly enhanced 5'-MA response to cold in the hypothalamus and the adrenal gland. Within the first 15 min of exposure enzyme activity in the hypothalamus of Hpx-rats increased 3-fold above basal values (220 vs 665), and practically doubled the response observed in NL rats. Furthermore, this hyperresponse of hypothalamic 5'-MA in Hpx animals persisted until the end of the study where the activity remained 2 times higher than the basal values. The biphasic pattern of enzyme activation by cold was preserved in the adrenal gland of Hpx animals. However, as compared to NL-rats, there was a precocious response of 5'-MA in Hpx animals occurring within the first 15 min of cold exposure and the activity of the enzyme increased 2-fold above basal values (230 vs. 545). The second rise in adrenal 5'-MA occurred after 120 min of cold exposure and its activity increased 2-fold above basal values.

Discussion

The present data show that in addition to the well known immediate activation of the SAS, the HPA and the hypothalamic-pituitary-thyroid axes of cold-stressed

animals (1, 2, 19-22), there is an acute and sustained increase of 5'-MA in the hypothalamus as well as a biphasic pattern of enzyme activation in the adrenal gland. Furthermore, 5'-deiodinase activity in these organs seems to be regulated by a complex interplay of feedback and feedforward neuroendocrine signals.

As judged by the increase in CT_a , NA, and T_3 , the rapid elevation of 5'-MA in those neuroendocrine structures directly involved in the immediate stage of the thermoregulatory response to cold, can be interpreted as indicative of a simultaneous rise in their metabolic and/or functional activity. The rapid onset and the time course of enzyme activation in the hypothalamus and the adrenal medulla, strongly suggest the involvement of nervous and/or neurohumoral triggering mechanisms, particularly of the sympathetic nervous system (SNS) which is known to be immediately activated during acute exposure to cold (19, 20), and mediates the hypothalamic release of TRH (2) and CRF (23). The elevated basal deiodinative activity in the adrenal gland of hypophysectomized animals, and the hypothalamic and adrenal 5'-MA hyperresponse during cold stress, are consistent with the well known compensatory hyperactivity of the SNS that follows panhypopituitarism (24). Hypophysectomy is accompanied by a selective increase in the turnover rate of hypothalamic NA and a simultaneous increase in the activity of tyrosine hydroxylase, the rate limiting enzyme of catecholamine biosynthesis (25, 26). Furthermore, this interpretation is strengthened by recent results demonstrating that unilateral (left) adrenal denervation (splanchnicotomy) caused a significant ipsilateral reduction in basal 5'-MA and a simultaneous increase in hypothalamic activity (manuscript in preparation). Taken together these data are in accordance with those studies demonstrating that both the nyctohemeral rhythm of 5'-MA-II in the pineal gland (6) and the activation of the enzyme in BAT (27) depend on sympathetic neural input.

Primary hypothyroidism in the rat is accompanied within 24 h after thyroidectomy by a 3-fold increase in cerebral cortex 5'-MA. This immediate response attains maximum values 5 days after surgery and within a month the enzyme activity declines to values similar to those observed during the initial response (28). In contrast present results demonstrate that basal hypothalamic 5'-MA is not modified 10 days after hypophysectomy. These data strongly suggest that the pituitary gland is also involved in the enzyme response to changes in thyroid status. This notion is strengthened by recent findings showing that several pituitary hormones, including GH and TSH (27, 29, 30), are involved in the control of peripheral 5'-MA in different vertebrate species (31).

As far as we know, this is the first study that reports the existence of 5'-MA in both components of the adre-

nal gland. This activity was not inhibited by PTU, suggesting that the enzyme corresponds to type II 5'-MA. Furthermore, in accordance with the well known sequence of neuroendocrine signals that initiate the acute thermoregulatory adaptive response to cold stress (19, 23), our results in normal rats demonstrate a characteristic time course of enzyme activation for the medulla and the adrenal cortex suggesting that adrenal 5'-MA is regulated by distinct mechanisms. The rapid response may be secondary to the immediate sympathetic activation that accompanies acute exposure to cold, whereas the slower increase of enzyme activity may be pituitary-ACTH dependent. Again, the results in hypophysectomized animals support this interpretation. Since the adrenal gland in these animals is hypotrophic, it is unlikely that the remaining glomerulosa layer may substantially contribute to the slower increase of enzyme activity, and therefore it is plausible to propose that the medulla might be the major contributor.

Studies in chronic primary-hypothyroid rats demonstrate that protein synthesis is not required to mediate the acute changes (4-6 h) observed after T_3 replacement therapy in cerebrocortical and pituitary 5'-MA-II (32). In contrast, NA-induced increase of BAT 5'-MA-II is mediated primarily through an α -1 receptor, and requires *de novo* protein synthesis. The response *in vivo* to NA or cold exposure occurs within 2 and 4 h, respectively (27, 33). These data indicate that either transcriptional or posttranscriptional mechanisms may be involved in regulating 5'-MA. In this context, and although not specifically analyzed in this work, it seems unlikely that new protein synthesis may participate in the immediate enzyme activation (15-30 min) detected in the hypothalamus and the adrenal medulla of cold exposed animals. Furthermore, in rat pineal a similar immediate increase of enzyme activity occurs few minutes after lights were turned off (6).

The present finding that hepatic 5' MA-I and circulating levels of T_4 remained constant is consistent with the notion that T_4 is the main regulator of this deiodinative pathway(s) (34). On the contrary, the significant decrease (33%) of basal T_3 and its further reduction during cold-stress (30 min, 70%) in hypophysectomized animals, suggest an increased metabolism of this iodothyronine after short-term exposure to cold and is in accordance with the absence of TSH that stimulates thyroidal 5'-MA-I, responsible for at least 20% of circulating T_3 (29). The lack of significant changes in pituitary 5'-MA, may be in part due to the cellular heterogeneity of the gland since both thyrotrophs and corticotrophs constitute only the 15% of the cell population in euthyroid male rats (35).

Besides confirming previous studies which are now classic in homeotherm thermoregulatory physiology, the

present results provide the first direct evidence that acute cold stress markedly enhances 5'-MA in the hypothalamus, the adrenal medulla, and the cortex. Furthermore, the time course and sequence of these responses, as well as the significant hyperresponse observed in hypophysectomized animals, strongly suggest that the sympathetic nervous system and the pituitary gland participate in their installation. These findings are consistent with previous reports describing the association of enhanced 5'-MA with the functional status of each organ, and support the notion that tissue-specific monodeiodinative activity is an index of local metabolic expenditure (9).

References

- Reichlin S, Martin JB, Mitnick MA, Bowshaw RL, Grimm Y, Bolinger J, Gordon J, Malacra J 1972 The hypothalamus in pituitary thyroid regulation. *Recent Prog Hormone Res* 28:229-286
- Fregly MJ 1989 Activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during exposure to cold. *Pharmacol Ther* 41:85-142
- Scammell JG, Barney CC, Fregly MJ 1981 Proposed mechanism for increased thyroxine deiodination in cold-acclimated rats. *J Appl Physiol* 51:1157-1161
- Rudas P, Pethes G 1986 Acute changes of the conversion of thyroxine to triiodothyronine in hypophysectomized and thyroidectomized chickens exposed to mild cold. *Gen Comp Endocrinol* 63:408-413
- Silva JE, Larsen PR 1985 Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J Clin Invest* 76:2296-2305
- Guerrero JM, Puig-Domingo M, Reiter RJ 1988 Thyroxine 5'-deiodinase activity in pineal gland and frontal cortex: nighttime increase and the effect of either continuous light exposure or superior cervical ganglionectomy. *Endocrinology* 122:236-241
- Murakami MK, Tanaka K, Greer MA 1988 There is a nyctohemeral rhythm of type II iodothyronine 5'-deiodinase activity in rat anterior pituitary. *Endocrinology* 123:1631-1635
- Kaplan MM 1984 The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamus-pituitary function. *Neuroendocrinology* 38:254-260
- Valverde-RC, Aceves C 1989 Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactating rats. *Endocrinology* 124:1340-1344
- Kahl S, Capuco AV, Bitman J 1987 Serum concentrations of thyroid hormones and extrathyroidal thyroxine 5' monodeiodinase activity during lactation in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 184:144-148
- Giral M, Villarroya F, Mampel T, Iglesias R 1986 Impaired basal and noradrenaline-induced iodothyronine 5'-deiodinase activity in brown adipose tissue from pregnant and lactating rats. *Biochem Biophys Res Comm* 138:1315-1321
- Smith PE 1930 Hypophysectomy and a replacement therapy in the rat. *Am J Anat* 45:205-273
- Aceves C, Legarreta GY, Valverde-RC 1982 Importancia del radioinmunoanálisis homologó de tiroxina en el suero de bovinos y caprinos. *Vet Mex* 13:207-212
- Luna MM, Romero-RCM, Valverde-RC 1990 Ensayo por competencia de unión a proteínas para cuantificar sin purificación previa, cortisol o corticosterona en el suero de algunas especies animales. *Vet Mex* 21:115-122
- Hjemdahl P 1984 Catecholamine measurements by high-performance liquid chromatography. *Am J Physiol* 247 Endocrinol Metab 10:E13-E20
- Leonard JK, Rosenberg IN 1950 Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinology* 124:1376-1383
- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Hintze LJ 1987 Number Cruncher Statistical System. Version 5.0 2/87. Kaysville, UT Cap 16.11-16.12
- Landsberg L, Saville EM, Young BJ 1984 Sympathoadrenal system and regulation of thermogenesis. *Am J Physiol* 247. *Endocrinol Metab* 10:E181-E189
- Himms-Hagen J 1975 Role of the adrenal medulla in adaptation to cold. In: *Handbook of Physiology. Adrenal Gland*, vol VI American Physiology Society, Washington, DC, pp 637-665
- Heroux O 1969 Catecholamines, corticosteroids and thyroid hormone in non-shivering thermogenesis under different environmental conditions. In: *Physiology and Pathology of Adaptation Mechanisms*, Pergamon Press, vol 27:347-366
- Gale CC 1973 Neuroendocrine aspects of thermoregulation. *Annu Rev Physiol* 35:391-430
- Plotsky PM, Cunningham ET, Widmaier EP 1989 Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev* 10:437-458
- Klioua N, Ruget G, Seltz F, Cuhe JL, Benmiloud M 1987 Plasma catecholamines after insulin hypoglycemia in sheehan's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 64:1323-1327
- Axelrod J 1975 Relationship between catecholamines and other hormones. *Recent Prog Horm Res* 31:1-35
- Andersson K, Eneroth P 1987 Thyroidectomy and central catecholamine neurons of the male rat. *Neuroendocrinology* 45:14-27
- Silva JE, Larsen PR 1986 Hormonal regulation of iodothyronine 5'-deiodinase in rat brown adipose tissue. *Am J Physiol* 251:E639-E643
- Leonard JL, Kaplan MM, Visser TJ 1981 Cerebral cortex responds rapidly to thyroid hormones. *Science* 214:571-573
- Erickson VJ, Cavalieri RR, Rosenberg LL 1982 Thyroxine 5'-deiodinase of rat thyroid, but not that of liver, is dependent on thyrotrophin. *Endocrinology* 111:434-440
- Capuco AV, Keys JE, Smith JJ 1989 Somatotrophin increases thyroxine 5'-monodeiodinase activity in lactating mammary tissue of the cow. *J Endocrinol* 121:205-211
- Kuhn ER 1990 Hormonal control of peripheral monodeiodination in vertebrates. In: *Epple A, Seanes CG, Stetson MH (eds). Progress in Comparative Endocrinology*. Progr Clin Biol Res. Wiley-Liss, Inc, vol 342:421-426
- Leonard JL, Silva JE, Kaplan MM, Meilen SA, Visser TJ, Larsen PR 1984 Acute posttranscriptional regulation of cerebrocortical and pituitary iodothyronine 5'-deiodinase by thyroid hormone. *Endocrinology* 114:998-1004
- Mills I, Raasmaja A, Moolten N, Lemack G, Silva JE, Larsen PR 1989 Effect of thyroid status on catecholamine stimulation of thyroxine 5'-deiodinase in brown adipocytes. *Am J Physiol* 256:E74-E79
- Kaplan MM 1986 Regulatory influences on iodothyronine deiodination in animal tissues. In: *Hennemann G (ed) Thyroid Hormone Metabolism*. Marcel Dekker, Inc, pp 231-253
- Surks MJ, Defesi CR 1977 Determination of the cell number of each cell type in the anterior pituitary of euthyroid and hypothyroid rats. *Endocrinology* 101:946-958

Rapid Communication

Evidence for Liver Epinephrine

I. S. Racotta¹, L. Navarro² and R. Racotta¹¹Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I. P. N.²Instituto de Investigaciones Biológicas, U. N. A. M., Mexico D. F., Mexico

Introduction

Works done in our laboratory reported years ago the presence of epinephrine (E) and of chromaffin cells in the liver (Racotta, Vega and Russek 1972; Martinez, Racotta and Russek 1974). Recently it has been shown that several organs can synthesize E, including liver (Ziegler, Kennedy and Elyan 1988). The present work was done in order to confirm the presence of liver E and to explore its possible independence from circulating E.

Materials and Methods

Three groups of 12 female Wistar rats each were used. They were held in individual cages, at least 5 days before sacrifice, in a room with light-on between 8 AM and 20 PM and regulated temperature $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Tap water and food (rodent Purina chow) were supplied ad libitum. The rats were sacrificed between 9 and 11 AM after 18 h of fast.

The rats of the first group were sacrificed by decapitation (group D). Trunk blood was immediately collected in 5 ml of cold 10% trichloroacetic acid (TCA) solution and weighed. The abdomen was opened, liver was excised, weighed and homogenized in 10 ml TCA. Rats of the second and third group were anesthetized with i. p. sodium pentobarbital (35 mg/kg). After opening the abdomen, the hepatic portal vein was ligated and incised proximally to the liver. In group I, 10 ml of 0.9% saline solution at 37°C was slowly perfused through the suprahepatic vein to flush the blood out of the liver. Completion of the flushing was ensured by observing fluid coming out through the portal incision and by the loss of color of the liver. Other 12 rats (group A) were handled in the same way but hepatic blood was not flushed away. Livers in group I and A were excised and treated as previously described for group D.

Blood and liver samples were centrifuged at 3500 rpm for 15 min. Catecholamines were isolated from the supernatant by adsorption on alumina; E and norepinephrine (NE) content was determined by HPLC with electrochemical detection.

The data were analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Newman-Keuls mean comparison. Simple linear correlation analysis of liver/blood E was made for group D.

Results

The results (Table 1) show high NE concentrations in liver but also the presence of E. Decapitation significantly decreased hepatic NE ($F(2,33) = 7.03$, $p < 0.005$) as compared with anesthetized rats but induced no change in E concentration.

In group D, E levels in blood and liver were similar. Considering that total hepatic extracellular fluid in exsanguinated rats represents at most 20% of liver weight, we corrected hepatic E concentration by blood E for each rat in group D. The mean concentration of

Table 1 Liver and blood catecholamine concentrations

Group		NE (ng/g)	E (ng/g)
D	liver	118.5 ± 12.9	4.07 ± 0.33
	blood	2.74 ± 0.30	4.83 ± 0.38
A	liver	$157.1 \pm 7.3^*$	3.47 ± 0.26
I	liver	$162.2 \pm 5.0^*$	4.00 ± 0.24

Values are means \pm SE, $n = 12$ rats per group.

* $p < 0.01$ vs group D by Newman-Keuls test.

corrected hepatic E was 3.9 ± 0.46 ng/g liver without extracellular fluid, which is not different from E concentration neither of group I, in which blood was removed from the liver or of group A, whose livers were full of blood. Moreover, no correlation was found between individual values of blood and liver E in this same group ($r = -0.34$, $p = 0.31$), suggesting that hepatic E concentration does not depend on the circulating levels of the hormone.

Mean (\pm SE) body weights of groups D, A and I were very similar: 259.9 ± 9.7 , 273.7 ± 11.3 and 274.2 ± 11.2 , respectively. However, mean liver weights, as expressed per body weight, were lower in D than in A and I groups (2.70% vs 2.92% and 2.94% respectively). This difference of about 8% in liver weight was most probably due to the hemorrhage produced by decapitation. As such it should be more correct to express CA per liver and not per gram of liver. The data calculated in such a way showed that the differences in NE liver content between group D and groups I and A were even greater ($F(2,33) = 11.72$, $p < 0.0001$). No differences for E were found.

Discussion

Decapitation reduced liver NE which is in accordance with the fact that hemorrhage specifically increases liver sympathetic activity (Briand, Yamaguchi and Gagne 1989).

Concerning E, this study confirms previous observations about its presence in liver (Racotta, Vega and Russek 1972). In addition, the present results show that: (a) blood and liver concentrations of the same rats were not correlated; (b) flushing blood out of the liver with saline did not affect liver E content as shown by similar concentrations in groups A and I; (c) decapitation decreased liver blood content, as shown by the reduction in the relative liver weight (group D vs group A), but did not change hepatic E content and (d) liver E corrected by blood concentration was not different from total liver E concentration. All this suggests that the liver has its own E in concentrations similar or greater than those reported recently in lung and kidney (Kennedy, Elyan and Ziegler 1990; Ziegler, Kennedy and Elyan 1989), respectively.

E can be taken up into the sympathetic terminals of several organs (Sudo 1985), showing it could act as a neurotransmitter not only in lower vertebrates, in which E seems to be the principal sympathetic transmitter (Iversen 1967), but even in mammals, specially in rats (Berecek and Brody 1982). On the other hand, E can also be synthesized in extra-neuronal locations (Ziegler, Kennedy and Elayan 1988), e. g. in liver chromaffin cells described in a previous work of our laboratory (Martinez, Racotta and Russek 1974). These two possibilities, i. e. the presence of intra- and extra-neuronal E, are not incompatible. Kwitnansky, Weise, Thoa and Kopin (1979) suggested that, although sympathetic nerves could take up and release E, there are extra-neuronal and extra-adrenal sites for storage of E. Further studies are needed to elucidate the exact localization of liver E.

E could play a physiological paracrine role in the liver: local E secretion, in addition to NE released from sympathetic nervous terminals, may enforce NE actions on and/or have important correlative effects. For example, it has been argued that experimental E doses necessary to produce hepatic glycogenolysis are much greater than the circulating concentration attained even during stress (Ezdinli and Sokal 1966). Locally secreted E could however reach significant concentrations in order to modulate liver metabolism.

Acknowledgements

We dedicate this work to our friend and teacher the late Dr. Mauricio Russek. We gratefully acknowledge the invaluable help of Dr. Eulogio Bordas in revising the manuscript and of Dr. Carlos Valverde in whose laboratory catecholamine determinations were

performed. This work was partially financed by DEPI-IPN project No. 901768. R. R. is fellow of DEDICT-COFAA-IPN.

References

- Berecek, K. H., M. J. Brody: *Am. J. Physiol.* 242: H593-H601 (1982)
 Briand, R., N. Yamaguchi: *J. Gagne. Am. J. Physiol.* 257: R317-R325 (1989)
 Ezdinli, Z., Y. E. Sokal: *Endocrinology* 78: 47-54 (1966)
 Kennedy, B., H. Elayan, M. G. Ziegler: *Am. J. Physiol.* 258: L227-L231 (1990)
 Kwitnansky, R., V. K. Weise, N. B. Thoa, I. J. Kopin: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 209: 287-291 (1979)
 Iversen, L. L.: *The Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves*. Cambridge University Press, London (1967), pp. 26, 35-36
 Martinez, J., R. Racotta, M. Russek: *Life Sci.* 15: 267-271 (1974)
 Racotta, R., C. Vega, M. Russek: *Federation Proc.* 31: 309 Abs. (1972)
 Sudo, A.: *Jpn. J. Pharmacol.* 38: 367-374 (1985)
 Ziegler, M. G., B. Kennedy, H. Elayan: *Life Sci.* 43: 2117-2122 (1988)
 Ziegler, M. G., B. Kennedy, H. Elayan: *J. Clin. Invest.* 84: 1130-1133 (1989)

Requests for reprints should be addressed to:

Dr. Radu Racotta

Depto. de Fisiología, E. N. C. B., I. P. N.
 Prol. de Carpio y Plan de Ayala
 México D. F. 11340 (México)

El antidepresivo amitriptilina en suero: extracción, análisis y cuantificación en serie por cromatografía líquida de alta presión

Ma. de la Luz Navarro*
Miguel Angel Santini*
Araceli Guarneros*
Ma. del Carmen Lara*
Juan Ramón de la Fuente*
Alejandro Bayón*

Abstract

In this work we present an "on line" HPLC method for the extraction, separation and measurement of amitriptyline and nortriptyline in serum. The precolumn used was packed with Corasil/Bondapak, C18 support and the analytical column was a μ -Bondapak C18, the mobile phase giving the best results (resolution) was (triethylamine 30 mM pH 5/Acetonitrile (67/33). Doxepin was used as an internal standard. The sensitivity of the method was better than 10 ng/injection and interassay variation was 4.3% for amitriptyline.

This method, although slightly more expensive than those using batch extraction procedures is faster and more reproducible, allowing the automatization of the analysis.

Resumen

Se presenta un método para la determinación por cromatografía líquida de alta presión del antidepresivo tricíclico amitriptilina y su metabolito nortriptilina, en suero, empleando doxepina como estándar interno.

La purificación de la muestra se lleva a cabo haciéndola pasar por una precolumna montada en el sistema cromatográfico. El soporte cromatográfico empleado es C18 y la fase móvil es trietilamina 30 mM pH 5/ACN (67:33). La sensibilidad obtenida es de menos de 10 ng por inyección y el coeficiente de variación intraensayo para suero es de 4.3% para amitriptilina.

El método presentado aquí, aunque resulta ligeramente más costoso que los procedimientos tradicionales de extracción, es más rápido y más reproducible, permitiendo la automatización del análisis.

Introducción

Los antidepresivos tricíclicos han sido ampliamente empleados en la práctica psiquiátrica para el tratamiento de la depresión endógena. Sin embargo, y debido en gran medida a las variaciones interindividuales de los procesos farmacocinéticos a los que están sometidos estos medicamentos, la respuesta clínica presenta amplias variaciones. Se ha propuesto que esta respuesta se encuentra más correlacionada con los niveles plasmáticos de estos fármacos que con la dosis ingerida. De hecho se sugiere que los niveles en sangre proporcionan un indicador exacto y útil para la dosificación de cada paciente^(1,9).

*Unidad de Desarrollo de Técnicas Analíticas para la Investigación en Psiquiatría y Neuroquímica IMP-UNAM e Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM.

En condiciones terapéuticas la concentración de estos medicamentos en el plasma es baja, en el intervalo de 20 a 500 μ g/ml⁽¹⁾. Para la medición de estos niveles se han empleado métodos como dilución isotópica⁽¹⁰⁾ y radio-inmunoanálisis⁽²¹⁾ que implican trabajar con material radiactivo y la necesidad, en el caso del radio-inmunoanálisis, de contar con los anticuerpos específicos para cada compuesto. Un método sensible y específico para la medición de los antidepresivos tricíclicos está dado por el acoplamiento de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas^(4,7); sin embargo, este método es caro y no se encuentra fácilmente a disposición. También se ha empleado la cromatografía de gases con detectores específicos, como el Detector de Nitrógeno/Fósforo^(2, 5, 6) o el Detector de Captura de Electrones en combinación con la formación de derivados halogenados^(11, 12, 13). La cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) con detección por absorción en el ultravioleta, elimina la necesidad de formación de derivados para la detección de los antidepresivos tricíclicos y permite la determinación de metabolitos no volátiles^(3, 8, 14, 15, 20, 23, 24).

Exceptuando la dilución isotópica y el radioinmunoanálisis, todos los otros métodos mencionados requieren uno o varios pasos de purificación previos al empleo del sistema cromatográfico, ya sea que se trate de extracciones a varios pH^(2, 7, 11, 20), del paso de la muestra a través de una columna de celulosa^(12, 13) o bien del empleo de pequeñas columnas empacadas comercialmente como Sep-pak o Bon-elut C18^(3, 18).

La mayoría de los autores que emplean CLAP usan columnas de sílica, cuyo empleo rutinario resulta problemático; sólo algunos autores emplean columnas de fase reversa C18^(8, 20) C8⁽¹⁸⁾ o CN⁽¹⁵⁾.

El método que aquí describimos contempla la purificación en serie de la muestra (suero), mediante el uso de una precolumna que además la concentra; posteriormente los antidepresivos se separan en una columna de fase reversa. Empleando este método, el suero sólo necesita filtrarse para evitar posibles obstrucciones en la precolumna o en la columna analítica, antes de ser introducido al sistema cromatográfico. Este método fue optimizado para emplearse en la determinación de amitriptilina (AMT) y nortriptilina (NT) usando doxepina como estándar interno.

El antidepresivo amitriptilina en suero: extracción, análisis y cuantificación en serie por cromatografía líquida de alta presión

Ma. de la Luz Navarro*
Miguel Angel Santini*
Araceli Guarneros*
Ma. del Carmen Lara*
Juan Ramón de la Fuente*
Alejandro Bayón*

Abstract

In this work we present an "on line" HPLC method for the extraction, separation and measurement of amitriptyline and nortriptyline in serum. The precolumn used was packed with Corasil/Bondapak, C18 support and the analytical column was a μ -Bondapak C18; the mobile phase giving the best results (resolution) was triethylamine 30 mM pH 5/Acetonitrile (67/33). Doxepin was used as an internal standard. The sensitivity of the method was better than 10 ng/injection and interassay variation was 4.3% for amitriptyline.

This method, although slightly more expensive than those using batch extraction procedures is faster and more reproducible, allowing the automatization of the analysis.

Resumen

Se presenta un método para la determinación por cromatografía líquida de alta presión del antidepresivo tricíclico amitriptilina y su metabolito nortriptilina, en suero, empleando doxepina como estándar interno.

La purificación de la muestra se lleva a cabo haciéndola pasar por una precolumna montada en el sistema cromatográfico. El soporte cromatográfico empleado es C18 y la fase móvil es trietilamina 30 mM pH 5/ACN (67/33). La sensibilidad obtenida es de menos de 10 ng por inyección y el coeficiente de variación intraensayo para suero es de 4.3% para amitriptilina.

El método presentado aquí, aunque resulta ligeramente más costoso que los procedimientos tradicionales de extracción, es más rápido y más reproducible, permitiendo la automatización del análisis.

Introducción

Los antidepresivos tricíclicos han sido ampliamente empleados en la práctica psiquiátrica para el tratamiento de la depresión endógena. Sin embargo, y debido en gran medida a las variaciones interindividuales de los procesos farmacocinéticos a los que están sometidos estos medicamentos, la respuesta clínica presenta amplias variaciones. Se ha propuesto que esta respuesta se encuentra más correlacionada con los niveles plasmáticos de estos fármacos que con la dosis ingerida. De hecho se sugiere que los niveles en sangre proporcionan un indicador exacto y útil para la dosificación de cada paciente⁽¹⁹⁾.

*Unidad de Desarrollo de Técnicas Analíticas para la Investigación en Psiquiatría y Neuroquímica IMP-UNAM e Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM.

En condiciones terapéuticas la concentración de estos medicamentos en el plasma es baja, en el intervalo de 20 a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ⁽¹¹⁾. Para la medición de estos niveles se han empleado métodos como dilución isotópica⁽¹⁰⁾ y radio-inmunoanálisis⁽²¹⁾ que implican trabajar con material radiactivo y la necesidad, en el caso del radio-inmunoanálisis, de contar con los anticuerpos específicos para cada compuesto. Un método sensible y específico para la medición de los antidepresivos tricíclicos está dado por el acoplamiento de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas^(4,7); sin embargo, este método es caro y no se encuentra fácilmente a disposición. También se ha empleado la cromatografía de gases con detectores específicos, como el Detector de Nitrógeno/Fósforo^(2, 5, 6) o el Detector de Captura de Electrones en combinación con la formación de derivados halogenados^(11, 12, 13). La cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) con detección por absorción en el ultravioleta, elimina la necesidad de formación de derivados para la detección de los antidepresivos tricíclicos y permite la determinación de metabolitos no volátiles^(3, 8, 14, 15, 20, 23, 24).

Exceptuando la dilución isotópica y el radioinmunoanálisis, todos los otros métodos mencionados requieren uno o varios pasos de purificación previos al empleo del sistema cromatográfico, ya sea que se trate de extracciones a varios pH^(2, 7, 11, 20), del paso de la muestra a través de una columna de celulosa^(12,13) o bien del empleo de pequeñas columnas empaçadas comercialmente como Sep-pak o Bon-elut C18^(3, 18).

La mayoría de los autores que emplean CLAP usan columnas de sílica, cuyo empleo rutinario resulta problemático; sólo algunos autores emplean columnas de fase reversa C18^(8, 20) C8⁽¹⁶⁾ o CN⁽¹⁵⁾.

El método que aquí describimos contempla la purificación en serie de la muestra (suero), mediante el uso de una precolumna que además la concentra; posteriormente los antidepresivos se separan en una columna de fase reversa. Empleando este método, el suero sólo necesita filtrarse para evitar posibles obstrucciones en la precolumna o en la columna analítica, antes de ser introducido al sistema cromatográfico. Este método fue optimizado para emplearse en la determinación de amitriptilina (AMT) y nortriptilina (NT) usando doxepina como estándar interno.

Desarrollo Metodológico y Experimental

Material y equipo

Se empleó un Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (Waters Ass.) compuesto por los siguientes módulos: dos bombas, una de ellas modelo 510 y la otra modelo M45, un inyector universal modelo U6K, un detector de ultravioleta de longitud de onda variable modelo 490, una unidad de control y programación de flujos modelo 680 AGC, un módulo de datos modelo 730 y las columnas μ -Bondapak C18 (3.9 mm X 30 cm) y μ -Bondapak CN (3.9 mm X 30 cm), también de Waters Ass.

El acetonitrilo (ACN) y el metanol (MeOH) —ambos grado HPLC— que se emplearon, así como la trietilamina (TEA), se obtuvieron de Merck; el fosfato de sodio monobásico se obtuvo de Sigma Chemical Co.; el hidróxido de amonio, el fosfato de sodio dibásico y el ácido fosfórico se obtuvieron de J. T. Baker. Los filtros Millex HV de 0.45 μ m de poro, los Sep-packs C18 y el empaque Corasil/Bondapak C18 se obtuvieron de Millipore. La amitriptilina (AMT) fue obsequiada por los Laboratorios MSD. La norriptilina (NT) fue donada por los Laboratorios Eli Lilly, y la Doxepina por los laboratorios Ciba Geigy. El agua fue purificada por medio de un equipo de purificación de agua Milly-Q. Todos los solventes empleados fueron filtrados a través de membranas de 0.45 o 0.50 μ m de poro. El material de vidrio que se usó fue silanizado⁽⁹⁾.

Montaje experimental

Los módulos de cromatografía de líquidos se dispusieron y conectaron como se muestra en el diagrama de la figura 1. La unidad de control y programación de flujos es capaz de controlar a las dos bombas, a la válvula selectora de solventes y a la válvula selectora de

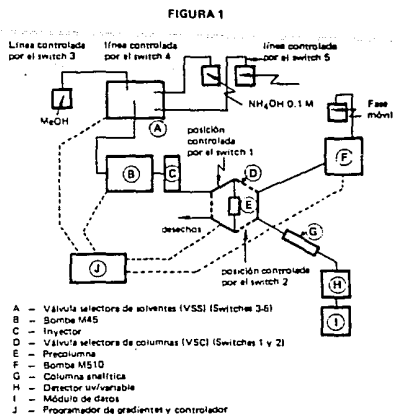


FIGURA 1. Configuración del equipo necesario para la purificación en líneas de las antidepresivos tricíclicos.

columnas, permitiendo la programación tanto del porcentaje con que cada bomba contribuye al flujo total, como de la apertura y cerrado de las diferentes válvulas.

El programa empleado, listado en la tabla 1, involucra las siguientes acciones: La bomba B alimenta al sistema con la fase móvil, mientras que la bomba A introduce el resto de los solventes. Antes de introducir la muestra al sistema, y hasta el minuto 5 después de su introducción, la bomba A hace pasar NH_4OH 0.1 M por la precolumna, mientras que por la columna analítica está pasando la fase móvil. En estas condiciones se introduce la muestra al sistema, y los antidepresivos

TABLA 1

PROGRAMA DE GRADIENTE					PROGRAMA DE EVENTOS		ACCIONES RESULTANTES	
Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A (M45)	%B (M510)	Switch No.	Acción	Válvula Correspondiente y Acción Involucrada	Bomba A	Bomba B
0.00	4	50	50	4	on	VSS se abre la línea de NH_4OH 0.1 M	NH_4OH , 0.1 M a 2 ml/min por la precolumna	Fase móvil a 2 ml/min, por la columna principal
0.10				4	off			
5.00	4	50	50			VSS se abre la línea de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 50/50	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50) a 5 ml/min, por la precolumna	
5.01	7	71	29	5	on			
5.11				5	off			
7.00	7	71	29			VSC. Se invierte la ruta del flujo	MeOH a 0.5 ml/min, para la precolumna y VSC y al desecho.	Fase móvil a 2 ml/min, por la columna principal.
7.01	2.5	20	80	2	on			
7.02				3	on			
7.11				2	off			
7.12				3	off			
9.00	2.5	20	80			VSC. Cambia la ruta del flujo a su posición original (Bomba A alimenta a precolumna y Bomba B a columna principal)	MeOH a 3 ml/min por la precolumna	Fase móvil a 2 ml/min por la columna principal
9.01	5	60	40	1	on			
9.11				1	off			
13.00				4	on	VSS se abre la línea de NH_4OH 0.1 M	NH_4OH 0.1 M a 3 ml/min por la precolumna	
13.10				4	off			

VSS, Válvula selectora de solventes

VSC, Válvula selectora de columnas

se retienen en la precolumna. Al minuto 5 se cierra la línea del NH_4OH y empieza a pasar por la precolumna $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50); esta mezcla eluye parte de los contaminantes del suero. Al minuto 7 cambia la posición de la válvula selectora de columnas y empieza a pasar la fase móvil tanto por la precolumna como por la columna analítica, llevándose a los antidepressivos de la 1a. hacia la 2a. Al minuto 9 cambia nuevamente la posición de la válvula selectora de columnas, y mientras que por la columna analítica continúa pasando la fase móvil, que termina de eluir a los antidepressivos, la precolumna se lava con MeOH hasta el minuto 13 en que empieza a pasar NH_4OH 0.1 M para que la precolumna esté lista para la siguiente inyección.

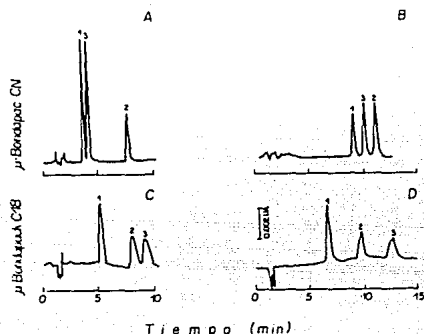


Figura 2. Comparación de la separación de los antidepressivos: 1) doxepina, 2) nortriptilina y 3) amitriptilina.
Fase Móvil
A) $\text{ACN}/\text{MeOH}/\text{Buffer}$ fosfatos 10 mM pH 7 (60/15/25).
B) ACN/Buffer fosfatos 10 mM pH 7 (70/30).
C) ACN/TEA 30 mM pH 4 (33/67).
D) ACN/TEA 30 mM pH 5 (33/67).

*Tamaño de partícula 10 μm
UA. Unidades de absorbancia.

Elección del soporte cromatográfico y del eluyente (fase móvil)

Para la separación de AMT, NT y doxepina (empleada como estándar interno) se probaron dos tipos de fases estacionarias: μ -Bondapak C18 y μ -Bondapak CN.

Para la separación de los antidepressivos se reprodujeron las condiciones reportadas por P. Koteel⁽¹⁵⁾. En estas condiciones la resolución entre AMT y NT no era óptima y sus tiempos de retención no eran lo suficientemente grandes para permitir que eluyeran antes los contaminantes del suero (Fig. 2a.). Se decidió aumentar la polaridad de la fase móvil, obteniéndose así la separación mostrada en la figura 2b, en que aún no se logra una resolución a nivel de línea base.

Para la columna de C18 nos basamos en el método reportado por Millipore⁽⁸⁾, como fase móvil empleamos TEA 30 mM a diferentes pH, mezclada con ACN en varias proporciones. En la figura 2c y 2d se muestran dos combinaciones diferentes. La figura 2d muestra la separación más satisfactoria; además, los tiempos de re-

tención obtenidos dejan espacio para la elución de suero (fig. 6a). Esta fase móvil, TEA 30 mM llevada a pH de 5 con ácido fosfórico y en una proporción de 67 por 33 de ACN, permite además una rápida elución de los antidepressivos de la precolumna (figura 3a y 3b).

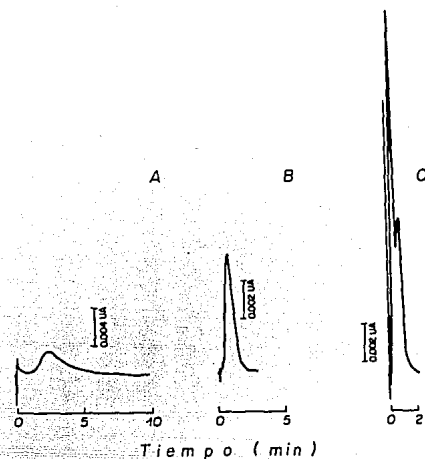


Figura 3. Perfil de elución de los antidepressivos tricíclicos a través de la precolumna.

A) Empaque Sep-pak C18. Fase móvil: ACN/Buffer fosfatos 10 mM pH 7 (70/30). Flujo 2 ml/min.
B) Empaque Sep-pak C18. Fase móvil: ACN/TEA 30 mM pH 5 (33/67). Flujo 2 ml/min.
C) Empaque Corasil/Bondapak C18. Fase móvil: ACN/TEA 30 mM pH 5 (33/67). Flujo 2 ml/min.

UA. Unidades de absorbancia.

Elección de la precolumna

Inicialmente se empleó como empaque el contenido de un Sep-pak C18. Sin embargo, éste, al ser de granulometría relativamente grande (80 μm), no soportaba bien la presión a que era sometido y se fraccionaba llegando a tapan la tubería; para resolver el problema, este empaque se substituyó por Corasil/Bondapak C18, de granulometría más pequeña (50 μm). Además, este último empaque favorece la separación de los antidepressivos aún en la precolumna. Compárense los perfiles de elución mostrados en las figuras 3b y 3c; en 3b se observa un solo pico, mientras que en 3c ya hay una ligera separación. En cuanto a la capacidad de la precolumna para concentrar la muestra, en las figuras 5a y 5b puede apreciarse que se puede inyectar un ml de muestra sin pérdida de la resolución.

Optimización de los programas de flujos

Cargado de la muestra en la precolumna. Se probaron diferentes tiempos de cargado de la muestra en la precolumna (3, 5 y 7 min.), así como diferentes solventes

de cargado (H_2O y NH_4OH 0.1 M), encontrándose que un tiempo de 5 minutos y una solución de NH_4OH 0.1 M resultaban adecuados.

Elución de la muestra de la precolumna. Cargada la muestra en la precolumna, ésta se somete a un lavado con $MeOH/H_2O$ (50/50) y posteriormente se le hace pasar la fase móvil (TEA 30 mM, pH 5/ACN 67/33). El tiempo de elución de los antidepresivos de la precolumna, empleando esta fase móvil, es de aproximadamente un minuto (ver figura 3c); para asegurar su completa elución se pasa la fase móvil por la precolumna durante dos minutos y posteriormente se lava con $MeOH$. Después se le hace pasar NH_4OH 0.1 M para que esté lista para la siguiente inyección (programa mostrado en la tabla I).

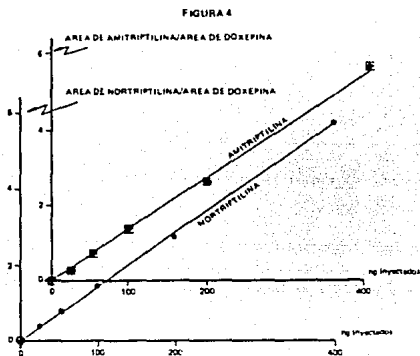


Figura 4. Curvas de calibración para AMT y NT empleando doxepina como estándar interno. Columna μ Bondapak C18. Fase móvil: ACN/TEA 30 mM pH 5 con ácido fosfórico (33/67); vol. de inyección 25 μ l, $\lambda = 240$ nm. 0.05 unidades de absorbancia (UA) a escala completa. Flujo 2 ml/min. Las curvas se corrieron empleando el sistema esquematizado en la figura 1 y los programas listados en la tabla I.

Sensibilidad y reproducibilidad del método

En la figura 4 se muestran las curvas de calibración obtenidas para AMT y NT empleando el sistema optimizado descrito en la figura 1 y los programas listados en la tabla I.

Véase que de 10 a 400 ng hay una respuesta lineal del detector y que la recta pasa por el origen, lo que significa que no hay pérdida de los antidepresivos en la columna; esto además se confirma por el hecho de que las muestras fueron inyectadas de menor a mayor concentración y, enseguida, de mayor a menor concentración y no se observó el fenómeno de histéresis. En esta misma figura puede observarse que la sensibilidad es menor a 10 ng.

En la tabla II se muestran los coeficientes de variación intra e intersayo obtenidos para estándares en concentraciones de 50 ng/inyección de AMT y NT y 100 ng/inyección de doxepina.

TABLA II

	Intraensayo		Intersayo	
	AMT	NT	AMT	NT
En agua*:	3.7-5.7 (n=3)	1.1-4.3 (n=3)	7.9 (n=3)	4.3 (n=3)
En suero:	4.3 (n=4)	3.7 (n=4)		

En todos los casos la cantidad de AMT y de NT es de 50 ng/inyección.

*Los estándares en agua se inyectaron por triplicado en tres ocasiones diferentes.

Resultados obtenidos usando suero humano como vehículo y criterio de especificidad del ensayo

En la figura 6 se muestran los cromatogramas obtenidos con un blanco de suero y con un suero que fue incubado con los estándares de AM, NT y doxepina. Nótese que en el blanco de suero no hay picos que interfieran con la elución de los antidepresivos.

En cuanto a la especificidad del ensayo, nótese que los cromatogramas están obtenidos para dos longitudes de onda: 240 y 214 nm; la relación:

$$\frac{\text{área del pico a 240 nm}}{\text{área del pico a 214 nm}}$$

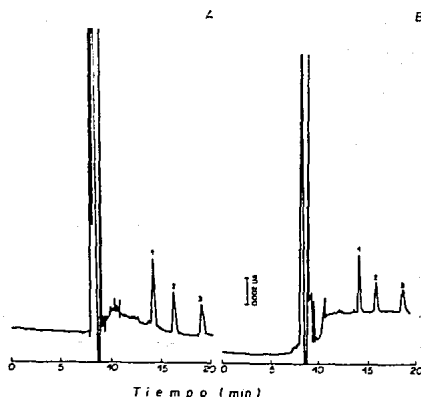


Figura 5. Comparación de los volúmenes de inyección. Las condiciones cromatográficas empleadas son las referidas en la Fig. 4.

A) Inyección de 50 ng de AMT y NT y 100 ng de doxepina en 25 μ l.

B) Inyección de 50 ng de AMT y NT y 100 ng de doxepina en 1000 μ l.

1) Doxepina, 2) norriptilina, 3) amitriptilina.

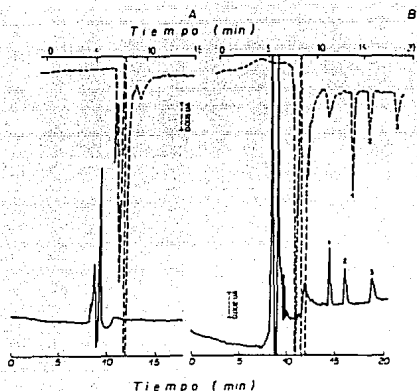


Figura 6. Perfil de elución de AMT, NT y doxepina empleando suero humano como vehículo. Las condiciones cromatográficas son las referidas en la Fig. 4. A) Inyección de 200 μ l de suero filtrados por un Millex-HV de 0,45 μ m de poro. B) Inyección de un ml de suero (1:1) incubado 30 min a 37°C con 50 ng de AMT y NT y 100 ng de doxepina, filtrado por un Millex-HV de 0,45 μ m de poro. 1) Doxepina, 2) nortriptilina, 3) amitriptilina.

es un parámetro de identificación y pureza del antidepresivo, ya que ésta es característica del espectro de absorción de cada compuesto.

Conclusiones

El empleo de válvulas para la purificación y análisis en serie de muestras de origen biológico permite la inyección directa de la muestra al sistema sin necesidad de pretratamiento y facilitando la automatización del análisis^{17, 22}.

El método aquí propuesto representa una herramienta útil para la determinación de AMT y NT en suero. El tiempo total de análisis por muestra es menor de 30 minutos e implica solamente filtrar el suero e introducirlo al sistema cromatográfico. La sensibilidad y variabilidad obtenidas son semejantes a las reportadas por otros autores^{16, 23}, y permitirán determinar los niveles endógenos de AMT y NT en los pacientes que estén bajo este tratamiento.

REFERENCIAS

- AMSTERDAM J, BRUNSWICK D, NENDELS J: The clinical application of tricyclic antidepressant pharmacokinetics and plasma levels. *Am J Psychiatry* 137: 653-662, 1980.
- BAILEY DN, JALTOW PI: Gas chromatographic analysis for therapeutic concentrations of amitriptyline and nortriptyline-plasma with use of a nitrogen detector. *Clin Chem* 22: 777-781, 1976.
- BEIRLE FA, HUBARD RW: Liquid chromatographic separation of antidepressant drugs: I Tricyclics. *Therapeutic Drug Monitoring* 5: 279-292, 1983.
- BIGGS J, HOLLAND WH, CHANG S, HIPPS PP, SHERMAN W: Electron beam ionization mass fragmentographic analysis of tricyclic antidepressants in human plasma. *J Pharm Sci* 65: 261-268, 1976.
- Bulletin 782A Supelco, Inc.
- DAWLING S, BRAITH WAITE RA: Simplified method for monitoring tricyclic antidepressant therapy using gas-liquid chromatography with nitrogen detection. *J Chromatogr* 146: 449-456, 1978.
- DUBOIS JP, KUNG W, THEOBALD W, WIRZ B: Measurement of clomipramine in biological fluids by selective ion monitoring and pharmacokinetics of clomipramine. *Clin Chem* 22: 892-897, 1976.
- FROST BA: QA-1TTM Analyzer tricyclic antidepressants method book preliminary manual. Millipore 1984.
- GARRET ER, HUNT CA: Physicochemical properties, solubility and protein binding of ⁹-tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci* 63: 1056, 1974.
- HAMMER W, BRODIE BB: Applications of isotopic derivative technique to assay of secondary amines:

- estimates of desipramine acetylation with ³H-acetic anhydride. *J Pharmacol Exp Ther* 157: 503-507, 1967.
- HARTVIG P, HANDL W, VESSMAN J, SVAHN CM: Electron capture of tertiary amines as pentafluorobenzyl carbamates. *Anal Chem* 48: 390-393, 1976.
- HARTVIG P, NASLUND B: Simultaneous determination of plasma amitriptyline and nortriptyline as trichloroethyl carbamates by electron-capture gas chromatography. *J Chromatogr* 133: 367-371, 1977.
- HARVIG P, STRANBERG S, NASLUND B: Determination of plasma amitriptyline by electron capture gas chromatography after oxidation to anthraquinone. *J Chromatogr* 118: 65-74, 1974.
- KNOX JH, JURAND J: Separation of tricyclic psychosedative drugs by high speed ion pair partition and liquid-solid adsorption chromatography. *J Chromatogr* 103: 311-326, 1975.
- KOTEEL P, MULLINS RE, GADSEN RH: Sample preparation and liquid chromatographic analysis for tricyclic antidepressants in serum. *Clin Chem* 28: 462-466, 1982.
- KRAAK JC, BIJSTER P: Determination of amitriptyline and some of its metabolites in blood by high pressure liquid chromatography. *J Chromatogr* 143: 499-512, 1977.
- LECAILLON JB, SOUPART C, ABADIE F: Determination of Metoprolol in human plasma by column switching high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 16: 158-161, 1982.

18. NARASIMHCHARI N: Evaluation of C18 Sep-pack cartridges for biological sample clean-up for tricyclic antidepressant assays. *J Chromatogr* 225: 189-195, 1981.
19. ORSULAK P J, SCHILDKRAUT J J: Guidelines for therapeutic monitoring of tricyclic antidepressant plasma levels. *Therapeutic Drug Monitoring* 1: 199-208, 1979.
20. PROELSS HF, LOHMAN HJ, MILES DG: High performance liquid chromatographic simultaneous determination of commonly used tricyclic antidepressants. *Clin Chem* 24: 1948-1953, 1978.
21. ROBINSON JD, RISBY D, RILEY G, WYNNE AHERNE G: A radioassay for the determination of combined amitriptyline and nortriptyline concentrations in microliter samples of plasma. *J Pharmacol Exp Ther* 205: 499-502, 1978.
22. ROTH W, BESCHKE K, JAUCH R, ZIMMER A, KOSS FW: Fully automated highperformance liquid chromatography. A new chromatograph for pharmacokinetic drug monitoring by direct injection of body fluids. *J Chromatogr* 222: 13-22, 1981.
23. VANDEMEREK FL, ADAMS RF, SCHMIDT GJ: Liquid chromatographic procedure for tricyclic drugs and their metabolites in plasma. *Clin Chem* 24: 87-91, 1978.
24. WATSON ID, STEWART MJ: Assay of structured drugs and their metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 134: 182-186, 1977.

6.2.9.2

Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas



XXXI
Congreso Nacional de
Ciencias Fisiológicas

Programa general
y resúmenes

Universidad Autónoma de Querétaro

Querétaro, Qro. Del 14 al 18 de agosto

62.9.2

MODIFICACIONES ORGAN-ESPECIFICAS DE TIPOANDAS Y ACTIVIDAD SEMIOTROPICA DURANTE LA RESPUESTA ALA DESTRONIZACION (RATES) AL PIDO. E. Alvarez S.P., C. Valverde, L. Navarro, M. Lopez, A. Alvarez del Arroyo y C. Alvarez.
 Dept. Fisiologia, Inst. Invest. Biomed., UNAM, A.P. Invest. Biomed., P.M.S.

Es bien conocido que en los experimentos hormonales la exposición al frío provoca un RSC que involucra la activación unidireccional del sistema simpático suprarrenal (SSA) y del eje hipofisario hipofisario testicular (HPT). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que existe un desarrollo fisiológico específico de la neuroendocrinología, estructuración de las principales tiroideas (tirocitos o T₁ y tirocitos coloidales) y se regula en forma cronometría y existe respuestas órgano-específicas acorde al grado estrofico que dicho órgano recibe. Así, y de acuerdo a la literatura mencionada (15); es el principal órgano involucrado en la RSC, entre otros, el sistema simpático suprarrenal (1) (Cruz Nuñez, Invest. Sci., 1971), examinamos y analizamos la actividad de este sistema SA y los cambios de intervenciones en su regulación durante la RSC. Material y Métodos. Se utilizaron ratas machos de 30 a 35 g, alimentados al libre albedrío y bajo condiciones controladas de iluminación (12h) y temperatura (22°C). El grupo experimental (expuesto al frío) se dividió en los siguientes intervalos: 15, 30, y 45 días. En cada uno de ellos se realizó el estudio del tronco por decantación y se determinó para cada grupo SA, el HPT y el control. En el primer se caracterizó por RM los niveles circulantes de T₁ y T₄ por RM los niveles de catecolaminas (CA) y por HPLC los niveles de SA. La actividad simpática se evaluó en SA por un estudio indirecto mediante la liberación de radiocarbono (¹⁴C) en el HPT, durante la liberación de radiocarbono (¹⁴C) en el HPT. Los resultados se expresaron como promedios porcentuales. Todos los valores representados con error estándar. A partir de los 15 días de exposición al frío, los niveles de CA se elevaron significativamente (2.4 ± 0.6 vs 3.0 ± 0.2 ng/ml, respectivamente). Los niveles de SA se elevaron significativamente en los grupos de 15 (2.1 ± 0.5 vs 3.0 ± 0.2 ng/ml), de 30 (3.0 ± 0.6 vs 4.2 ± 0.8 ng/ml) y de 45 (3.5 ± 0.7 vs 4.5 ± 0.8 ng/ml). Simultáneamente, en SA se elevaron significativamente (3.1 ± 0.6 vs 4.5 ± 0.8), mientras que la actividad de HPT y control no se modificó significativamente. Las concentraciones de CA, CA/SA y CA/HPT en el grupo de los 15 y 30 días aumentaron de forma significativa (17.0 ± 15.0 vs 30.0 ± 4.0 ng/ml, respectivamente), y la actividad SA en el 50 aumentó de forma significativa (1.7 ± 4.5). Estos resultados sugieren que la actividad SA en la corteza es 4 a 8 veces más que en la médula. Resultados y Conclusiones. Estos resultados confirman la importancia del SSA y del HPT en la RSC y sugieren que éste se activa a través de un mecanismo órgano-específico en la actividad de la vía SA. El curso temporal de los eventos analizados indica una interrelación funcional fuertemente controlada y sugiere que la regulación de la vía SA en la glándula SA es de naturaleza neurohormonal.

Reproducido parcialmente por el doctor GILBERTO PEYRÓ DE AGUIRRE.

EFFECTO DE LA ESDA SOBRE LA LIBERACION DEL FACTOR TIPOICO QUE IMPIDE LA ACCION DE LA HCG SOBRE LA CELULA DE LEYDIG EN RATA. J. A. Mesa-Speranza, J. A. y ROMANO M.C. Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Apartado Postal 14-740. 07000 México, D.F.

Se conoce desde hace tiempo la influencia que ejercen las gónadas sobre el desarrollo y función del timo. Actualmente se propone que esta influencia es bidireccional, es decir que también los órganos inmaduros modifican el desarrollo y función de las gónadas. Se ha observado que las ratas macho que son timectomizadas al nacer o en la primera semana de vida presentan infertilidad y trastornos gonadales. En nuestro grupo se ha demostrado que un factor extraído del extracto acetónico del timo (TT) de naturales proféticos con un peso molecular de 28 kDa modifica la unión de la HCG a la célula de Leydig en la rata a través de inhibición de tipo competitivo. El objetivo del presente trabajo fue investigar si el factor timico de 28 kDa se libera al medio de incubación y al este hecho depende de la edad del animal. Se utilizaron 0.5 gr de tiroides de ratas macho de distintas edades, los cuales se incubaron en Dublecco MEM albúmina durante 2 horas; se obtuvo el medio de incubación (MIT), el cual se concentró, liofilizó y se separó luego en una columna de filtración molecular de aranditas agarosa se evaluó la actividad de fracciones con peso molecular cercano a 28 kDa en una suspensión de células de testículo de rata adulta a la que se agregó un ml de HCG y la fracción de MIT al 20%. Se determinó la testosterona producida por radiocromatografía. En las fracciones se determinaron proteínas por el método de Bradford. En la tabla se muestra la inhibición de la respuesta a HCG producida por la fracción de 28 kDa, en diferentes edades.

EDAD (días)	RM	3	7	14
% de inhibición por % de proteína de la fracción de 28 kDa.	1.7	2.2	1.7	0.7

De nuestros resultados experimentales podemos concluir: 1. El timo libera al medio la fracción de 28 kDa que inhibe la respuesta a la HCG en la célula de Leydig. 2. La mayor actividad del TT se presenta en la primera semana de vida postnatal.

Proyecto apoyado en parte por CONACYT, clave PCSABNA-021181.

EFFECTO DE LA FSH SOBRE LA SECRECIÓN DE TESTOSTERONA POR EL TESTICULO DE POLLO RECIENTE NACIDO EN CULTIVO. Castro, J.J. y Alvarez M.C Depto de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CIEA del IPN, Apartado Postal 14-740. 07000 México D.F.

Durante el desarrollo ontogénico se describen en el testículo del macho y de las aves dos poblaciones celulares. Una es activa funcionalmente en la etapa prenatal y regresa hacia los 10 días de vida postnatal, y otra hace su aparición al final de la pubertad, para continuar activa por el resto de la vida del individuo. La primera población de células se desarrolla en un medio hormonal diferente de aquel del adulto, por lo que se puede esperar que su funcionamiento y respuesta a hormonas difiera del de la población puberal. Experimentos en nuestro laboratorio han demostrado que en la etapa neonatal es necesaria la presencia de SBF o bien de HCG para un adecuado funcionamiento de las células del testículo del pollo recién nacido; el efecto sinérgico de la PAI con la HCG para estimular la producción de testosterona y la influencia de la insulina sobre la secreción de testosterona. En el presente trabajo se estudió la importancia de la FSH en la función del testículo neonatal, utilizando como modelo el testículo del pollo recién nacido en cultivo. Se obtuvo una suspensión celular utilizando enzimas; las células se sembraron en cajas de cultivo que contenían medio Dublecco MEM sin suero. A las 48 hrs de cultivo se reemplazó el medio por otro conteniendo hormonas. Se utilizó FSH bovina (Sigma) y FSH de óvula púezca (NIH) de rata. La secreción de testosterona se evaluó por Radioinmunoanálisis y las proteínas se determinaron por Lowry. Se observó que la FSH (Sigma) estimula la producción de testosterona basal de una manera dosis-dependiente a 1.5×10^3 ng/ml de FSH. Dosis mayores ejercen un efecto inhibitorio. La curva temporal mostró que a la dosis de 100 ng/ml la hormona estimula la producción de testosterona a partir de las 2 hrs de incubación. Cuando se utilizó la FSH de NIH se observó que ésta es también capaz de estimular la producción de testosterona de manera dosis-dependiente, pero con diferencia de la FSH (Sigma), la respuesta estimuladora se observó recién a partir de 100 ng/ml. La curva temporal para la FSH de NIH muestra que ésta es capaz de estimular la producción de testosterona a partir de los 60 minutos de incubación utilizando una dosis de 100 ng/ml. Por otra parte la incubación por 6 hrs de un medio de cultivo que contiene las células a la HCG. Con los resultados anteriores podemos concluir que la presencia de FSH en el medio de cultivo juega un rol importante en la esteroidogénesis del testículo neonatal. Es probable que este efecto se sea mediado en parte por las células de Sertoli, a través de la producción de factores que modulan la secreción de testosterona.

Castro, J.J. Becaría de Conacyt.

MODIFICACIONES DEL DESARROLLO DEL TUBULO SEMINIFERO DE LA RATA POR LA ADMINISTRACION DE PROPIONATO DE TESTOSTERONA O BENZATO DE ESTRADIOL AL NACIMIENTO. Benítez, C. y Domínguez, F. Lab. Biología de la Reproducción, UNEP Zaragoza, S.A.U.V.

Los mecanismos hipotalámicos que regulan la secreción de gonadotropina son diferentes en el macho y en la hembra. Esta diferencia puede deberse a la influencia testicular ejercida en la vida testicular. Poco se conoce sobre los factores que se suceden en el tubulo seminifero de animales en los que se aumentan bruscamente los niveles circulantes de andrógenos o estrógenos al inicio de la vida extrauterina.

Ratas machos recién nacidas de la cepa C57 BL/2J fueron inyectadas s.c. con 100 µg de Propionato de Testosterona (PT), 10 µg de Benzato de Estradiol (BE) 0.05 ml de Vehículo (testigo) o se sacrificaron a los 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 días de edad. A la autopsia se pesaron los testículos, la próstata y la vesícula seminal. El testículo izquierdo fue fijado e incluido en parafina. Se realizaron cortes cada 50 µm y se determinó la superficie tubular, presencia de mitosis en espermatocitos I y II, espermatidias en maduración, espermatocitos y células anormales.

El peso de los testículos de los animales con PT disminuyó significativamente a partir de los 10 días de edad (16.2 ± 0.6 vs 24.4 ± 0.5, P<0.05), mientras que en los esteroidizados la disminución no observó a partir de los 30 días (46.2 ± 3.9 vs 85.1 ± 1.5, P<0.05). En los animales con BE la superficie tubular no mostraron un modelo permanente a lo largo de las edades estudiadas, excepto a los 60 días, en los que se observó disminución en los animales tratados con PT ó BE (67 ± 6 vs 78 ± 17 vs 93 ± 19 µm² × 10³, P<0.05). La aparición de espermatidias en maduración se retrasó en los animales androgenizados y esteroidizados; a los 30 días 12% de los tubúlos de los animales testigo presentaban espermatidias vs 0.0% de los tratados (P<0.05), lo que se acompañó al aumento de la presencia de células anormales en los animales tratados. A los 60 días, los animales tratados con PT presentaron disminución de la espermatocitogénesis, de la espermatogénesis y aumento de la presencia de células anormales. En cambio, el tubulo seminifero de los animales esteroidizados fue similar al del grupo testigo, a pesar de la baja testosterona.

Nuestros resultados sugieren que la androgenización al inicio de la vida provoca cambios gruesos en el proceso de formación de gametos, tanto en el macho como en la hembra. Es posible que estas alteraciones estén vinculadas tanto a las modificaciones del modelo de secreción de gonadotropina, como a cambios en el propio testículo.

* Apoyado por C.O.N.A.C.Y.T, convenio PCSABNA 50972 y PUIB.

Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas



XXXII
Congreso Nacional de
Ciencias Fisiológicas

Programa general
y resúmenes

Oaxtepec, Mor., Septiembre 3 al 7

1989

LA ADMINISTRACION "IN VIVO" DE TESTOSTERONA MODIFICA LA LIBERACION "IN VITRO" DEL FACTOR TIMICO QUE INHIBE LA ACCION DE LA HCC SOBRE LA CELULA DE LEYDIG EN LA RATA.

Reyes-Espartero J.A., Mejia C.A. y Romano M.C. Depto. de Fisiologia, Biofisica y Neurociencias. Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del IPN. Apartado Postal 14-740. 07000 Mexico, D.F.

Se ha propuesto que el Tazo tiene influencia en el desarrollo y función del testículo, especialmente en la etapa prenatal. Se ha observado la presencia de un factor en el medio de incubación de tazo de rata macho, que inhibe la acción de la HCC sobre la célula de Leydig, este factor muestra mayor actividad en la primera semana y alcanza una máxima en la segunda semana, la cual se mantiene hasta la etapa adulta. El objetivo del presente trabajo fue investigar si la testosterona, administrada "in vivo" y en experimentos agudos, puede influir en la liberación "in vitro" del mencionado factor. Se utilizaron 0.5 g de tazo de ratas macho de 14 días, a las que se les administró 1 mg de testosterona o el vehículo aceite de maíz S.C. 24 horas antes de la obtención de los órganos los cuales se incubaron en Diluente PMF durante 2 horas; se obtuvo el medio de incubación, el cual se concentró por liofilización y se eluyó en una columna de filtración molecular de acrilamida agarosa. Se evaluó la actividad de las fracciones con peso molecular cercano a 26 KDa. en una suspensión de células de testículo de rata adulta a la cual se agregó la fracción de Medio de Incubación al 2% y a 1 ml de HCC. Se determinó la testosterona producida por radioluminancia. Se determinaron proteínas por el método de Bradford. Las fracciones de Medio de Incubación de animales tratados tuvieron una mayor concentración de proteínas que los provenientes de los animales control o que recibieron sólo el vehículo, además de producir una mayor inhibición y la acción de la HCC sobre las células del testículo. De nuestros resultados podemos concluir: Que la administración "in vivo" de 1 mg de testosterona 1.- estimula la liberación de proteínas con peso cercano a los 26 KDa.; y 2.- incrementa la actividad inhibitoria del factor tímico sobre la Célula de Leydig.

Proyecto apoyado en parte por CONACYT, clave PCSA2NA-231761.

INFLUENCIA AL SERO CAROTÍDEO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN LA SANGRE QUE MODIFICA EL TAZO DEL SERO EN LA HEMODINAMIA QUE REGULA LA RETENCION DE GLUCOSA POR EL CEREBRO.

Alvarez-Buylla, R. y Alvarez-Buylla de, F.* Depto. de Fisiología, Unidad de Investigación, INEF, México, D.F.

En estudios anteriores hemos descrito la influencia de la glucosa en la actividad de los quinorreceptores carotídeos. La infusión de glucosa en el seno carotídeo aislado despierta las descargas basales de estos receptores aumentando su actividad a la hipotisia. La información aferente de los receptores del cuerpo carotídeo causa una acción refleja sobre los niveles de glucosa en sangre con dos componentes eficaces: el aumento de la apropiación de glucosa hepática, y el aumento de la captación de glucosa por el cerebro. En este trabajo analizamos la influencia de distintas concentraciones de glucosa en el seno carotídeo sobre el consumo de glucosa cerebral. Los experimentos se realizaron en ratas anestesiadas con pentobarbital sódico mediante la captación de glucosa por el cerebro. Se utilizó una preparación de seno carotídeo perfundido "in vivo" (rata A) por otra rata perfundida (rata B). En experimentos control, el aumento en la actividad quinorreceptora después de la inyección de cianuro en la rata A, provocó retención de glucosa cerebral en la rata B. La perfusión del seno carotídeo con sangre eutrófica con glucosa reduce 30% la diferencia arteriovenosa (-av) de glucosa cerebral. Por el contrario, la perfusión con sangre hipoglucémica (50mg/dl), por inyección de insulina en la rata B, aumentó 25% la diferencia av de glucosa cerebral. En 5 min después de iniciada la perfusión. Estos resultados indican que continuamente, y desde época prenatal, la información del sero carotídeo es importante en la regulación de la retención de glucosa por el encéfalo.

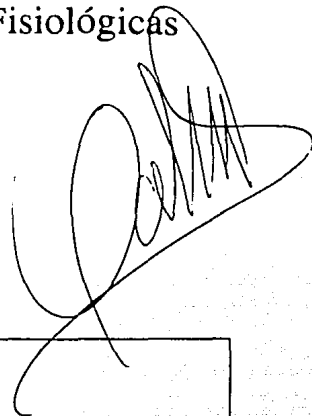
PARTICIPACION DE LOS COMPONENTES OPTICOC. (Ox), GOMFOS (Gom) E HEMODINAMIA HEPATICA EN LA ACTIVIDAD S/D SUBARAL (S/D) DE LA RATA DWARF B. H. ARGENTE SE., PARRA G., MONTES L., RIZZO DEL ANGEL M., LARA M.B., FLORES C. Y VALDEZ R. C. Depto. Fisiología, Inst. Invest. Bioméd. UNAM, C.I. ISS.

Analizamos observaciones previas acerca del incremento que ocurre en la actividad depuradora S/D S/R durante la respuesta aguda de termorregulación al frío (RAF); (Parrá 1983; Concha C. Fisiol., 0 44). Específicamente, este trabajo analiza la contribución de los componentes Ox y Gom, así como la participación reguladora de la unidad hipotalámica hipofisiaria, en esta actividad específica. MÉTODOS Y RESULTADOS. Se utilizaron ratas macho Wistar de 30 a 35 g. Los grupos experimentales (dependiendo al frío, 4 C; durante 15, 30, 60 y 120 min), wurden analizados integrando (Gom-int, mS) y animales hipofisectomizados (Ox-int, mS). Los animales fueron mantenidos a temperatura ambiente (G-int, mS) y G-int, mS). En los Hip transferridos diez días antes de iniciar los experimentos. En todos los animales se controló sangre por descalcificación y se descartaron entre S/R, Hígado (Hig), hipotálamo (H) y hipofisis (Hip). Se caracterizó por RIA los niveles circulantes de tiroxina (T4, ug/dl), triiodotironina (T3, ng/dl), T3 reversa (T3r, ng/dl); por CPA los de corticosteroides (Cort, ng/dl); y por HPLC los de noradrenalina (NA, y A, ng/dl). La actividad S/D se cuantificó mediante la liberación de radiocloro (que se liberó) en vejigas (H). Todos los valores se expresan como 1 + d.e. RESULTADOS. En el grupo G-int, la S/D de S/R aumentó a los 15 min (7.0 ± 1.0 Vs 8.5 ± 0.7), y a los 120 min (20.4 ± 10.0). El primer aumento se asoció al aumento en la Oa circulante (23.4 ± 15.6 Vs 30.2 ± 25.3), mientras que el segundo al de la (9.8 ± 0.4 Vs 30.2 ± 4.93). En contraste la S/D de S/R presentó un solo pico asociado a los 15 min (3.1 ± 1.5 Vs 4.3 ± 0.4), asociado a la elevación de NA circulante (3.06 ± 0.37 Vs 3.63 ± 0.68). En este mismo grupo, la actividad S/DH aumentó a los 15 min y se mantuvo elevada hasta los 60 min (11.3 ± 0.1 Vs 14.8 ± 2.2). La S/DHip se elevó hasta los 30 y 120 min (11.0 ± 3.5 Vs 12.4 ± 2.9). Los animales Hip transferridos presentaron el peso corporal, la S/R y el hígado se encontraron al mismo nivel que los animales controlados de 74 disminuyeron (1.4 ± 0.2 Vs 0.45 ± 0.2), mientras que los de T3 y T3r fueron incrementados. Los valores basales de la S/D fueron significativamente mayores que los encontrados en los animales Int (8.6 ± 0.8 Vs 3.6 ± 1.5); así mismo los niveles circulantes de Na y A no se modificaron. Durante la HCC la actividad S/DH en los animales Hip se incrementó a los 15 min (10.8 ± 0.5 Vs 16.4 ± 0.3); presentaron un aumento mayor a los 60 min (26.3 ± 3.0). La concentración circulante de NA presentó una elevación significativa a los 30 min, mientras que la A no se modificó. Los valores de la S/D S/R del grupo G-tipo se están analizando. DISCUSION Y CONCLUSIONES. Los resultados muestran que en animales Int la RAR se acompaña de un aumento en la actividad S/D en todos los órganos involucrados en la respuesta. La Hip procesa un incremento en la actividad endocrina basal, y durante la RAF ocurre una hipersensibilidad en la S/DH. La ausencia de aumento en la A del grupo G-tipo, confirman la dependencia central de la célula para la síntesis de A. Participación parcialmente por el dispositivo GID-723, PEDI/IN-GEA/Conacyt.

LES LA DEFICIENTE RESPUESTA AL ESTRÉS ES LA ÚNICA EXPLICACION PARA LOS TRASTORNOS NEUROENDOCRINOS INDUCIDOS POR CAPSICINA? ZARCO DE CORONADO, Coronado Zarco I.A., Paredes Guasale H.M., Aguilar Ojeda M. E. Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina UNAM.

El uso de algunos modelos de desensibilización alérgica y visceral producidos por algunos neuroefectores, como la capsicina, que destruye las células productoras de substancia P (SP), permite poner de manifiesto la participación de las vías aferentes en la integración de las respuestas neuroendocrinas, que son la base para el mantenimiento de las condiciones homeostáticas de los organismos. Este sistema, es apenas, el punto de partida para señalar al menos, algunos niveles de jerarquización en dicha integración. Los ratas que fueron inyectadas, a los 5 días de edad, con capsicina intrauterina, y posteriormente se les sometió a pruebas de natación mostraron: retardo de los índices de maduración de esta actividad conductual, analgesia, poliuria y polifagia y el aumento consiguiente del peso corporal, así como agrandamiento de la hipófisis. Estos resultados no se reproducieron siguiendo el mismo protocolo experimental, a excepción de que la capsicina fue analizada por vía subcutánea. Cabe señalar que este caso, la vía aferente determinó la lesión de la glándula pituitaria. Con estos datos se eliminó la posibilidad de que los procesos involucrados sean exclusivamente neurales intracerebrales. Así, los mecanismos propuestos para el aumento de la ingestión de agua y alimentos son: la disminución de las aferencias neuroendocrinas al núcleo del tracto solitario (NTS) o el área postrema (AP). b) la inhibición directa de la actividad de vías neuroendocrinas (NA) centrales, especialmente en áreas basales hipotalámicas (6 c) que la deficiente respuesta al estrés durante las pruebas de natación o de calor, ocasionada por la liberación reducida de SP, se acompaña de bajos niveles plasmáticos de hormona adreno cortico trófica (HACT). Por lo tanto, es de esperar escasa liberación de secreciones suprarrenales, moduladoras de la actividad metabólica y circulatoria. Este Glivo, puede a su vez, modificar la actividad de las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), en relación tanto a la regulación de los IF quíoricos corporales como a la ingestión de alimentos.

Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas



XXXIII
Congreso Nacional de
Ciencias Fisiológicas

Programa general
y resúmenes



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CLUB CAMPESTRE "VILLA PRIMAVERA"

Guadalajara, Jal., agosto 5 al 9
1990

... LA INFLUENCIA DE LA HORMONA DEL TIO QUE REGULA LA PRODUCCION DE PROLACTINA EN EL MAMARIO DE LA RATAS...

... EL MAMARIO LACTANTE DE LA RATAS... LA PRODUCCION DE PROLACTINA... EL MAMARIO LACTANTE DE LA RATAS...

ACTIVIDAD 5'-MONODESODATIVA (5' MA) EN LOS SISTEMAS SINAPTICO (SNS) Y ADRENAL (SA) DURANTE SOBREALIMENTACION (S/Alim) EN RATAS LACTANDO...

La modificación de la dieta afecta el gasto energético órgano-específico del individuo... La modificación de la dieta afecta el gasto energético órgano-específico del individuo...

ESTUDIOS COMPARATIVOS PRELIMINARES SOBRE LA SENSIBILIDAD A LOS ESTROGENOS EN EL PROCESO DE TURMORACION ADENOHIPOFISIARIA...

La formación de tumores adenohipofisarios, particularmente aquellos hipersecretores de prolactina, es una característica del envejecimiento en la rata... La formación de tumores adenohipofisarios, particularmente aquellos hipersecretores de prolactina...

GLUCOSA Y RESPIRACION ENCEFALICA. Alvarez-Buylla, R., Alvarez-Buylla de, E., Depto. de Fisiología, Unidad de Investigación, INER-SSA y Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV-IPN, México, D.F.

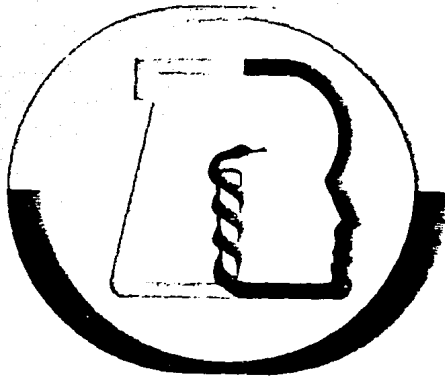
La homeostasis de la glucosa es base de la respiración y sus mecanismos neurofisiológicos los que intervienen en la regulación de la glucemia... La homeostasis de la glucosa es base de la respiración y sus mecanismos neurofisiológicos...

6.2.9.2 y

6.4



I CONGRESO NACIONAL ESTUDIANTIL



DE INVESTIGACION EN EL AREA DE LA SALUD

1-4 de Diciembre de 1987
Auditorio Principal
Facultad de Medicina, UNAM
Cd. Universitaria, México, D.F.

MONODOSYDACIÓN DE HORMONAS TIROIDEAS EN LA GLÁNDULA SUPRARENAL DE RATA. I. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA VÍA 5' DESYDOSA (5'D). Argüello S. Brenda, Valverde-R. Carlos, Navarro Luz y Aceves Carmen. Departamento de Fisiología. Instituto de Investigaciones Biomédicas y ENP-Itzacala. UNAM.

La termorregulación durante la exposición al frío en los organismos homeotermos incluye una respuesta inmediata o aguda y una crónica de instalación lenta pero sostenida. La respuesta aguda es de naturaleza simpática y esta mediada principalmente por catecolaminas, mientras que la crónica involucra entre otras a las hormonas tiroideas (Environmental Endocrinology. Springer-Verlag, 1978). Recientemente se ha reconocido que aproximadamente el 80% de la triyodotironina (T_3) circulante, la hormona tiroidea más activa, y el 100% de la triyodotironina reversa (rT_3), tirofina biológicamente inactiva, provienen de la monodosyodación periférica de la tirofina (T_4). Esta monodosyodación es órgano-específica y dependiendo del producto (T_3 o rT_3), la vía se denomina de activación (5'D) o de inactivación (5'D) (Endocr Rev 6: 87, 1985).

Por todo lo anterior y dado que la glándula suprarrenal es el principal órgano involucrado en la respuesta aguda de termorregulación, el presente trabajo se diseñó para analizar la participación de las vías desyodativas intraglandulares en dicha respuesta fisiológica.

Material y Métodos. Se utilizaron ratas macho Wistar de 200 a 250 g, alimentadas ad libitum y bajo condiciones controladas de iluminación (12:12 h). El grupo experimental (exposición al frío; 4°C), incluyó los siguientes intervalos de tiempo: 15, 30 y 60 min. En todos los animales se recolectó la sangre del tronco por decapitación y se diseccionaron ambas glándulas suprarrenales en frío. En el suero se cuantificaron los niveles circulantes de T_4 , T_3 , rT_3 por radioinmunoensayo (RIA); así como las concentraciones de noradrenalina (NA) y adrenalina (A) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) desarrolladas en el laboratorio. Las glándulas suprarrenales se homogenizaron en amortiguador de Hapes 10 mM pH 7.0; adicionado con EDTA-ácido- DTT (0.20 mM, 0.34 M, 10M respectivamente). La actividad 5'D se cuantificó mediante la técnica de liberación de radiyodo estandarizada recientemente en nuestro laboratorio (Mem XXX Congr Nac. C Fisiol. Resúmen # C-53, 1987), y se expresan como fmol/mg de proteína/hora.

Resultados. En el grupo experimental, los niveles circulantes de T_3 no se modificaron durante los primeros 30 min de exposición al frío; sin embargo, a los 60 min se incrementaron significativamente con respecto al control (106.7 ± 7.6 vs 64.3 ± 5.3 ng/dl, respectivamente). En contraste, las concentraciones de rT_3 permanecieron sin cambio. Los resultados preliminares de la actividad 5'D indican que la glándula suprarrenal presenta actividad enzimática Tipo II (no sensible a PTU). En el grupo experimental, la actividad 5'D prácticamente triplica el valor basal a los 30 min de exposición al frío y decae a los 60 min (ver tabla).

Sustrato	Control	15 min	30 min	60 min
rT_3	24.1 ± 7.1	25.6 ± 14.3	79.5 ± 20.0	41.1 ± 19.0
rT_3 + PTU	21.7 ± 2.4	27.2 ± 16.0	65.0 ± 18.0	30.8 ± 9.7

Discusión y Conclusiones. Los resultados radioinmunoquímicos confirman, que a mediano plazo la respuesta de termorregulación en los organismos homeotermos, involucra al eje hipotálamo-hipofisis-tiroidea. El hallazgo de que la actividad desyodativa de la glándula suprarrenal corresponde al Tipo II, concuerda con lo informado en el sistema nervioso central. Este hecho y el curso temporal del incremento en la actividad enzimática 5'D, que antecede a la activación tiroidea, sugieren que dicho incremento "agudo" pudiera estar mediado por mecanismos de naturaleza neural y/o endocrina. Actualmente se analizan las concentraciones de NA y A, y se realizan experimentos encaminados a conocer la participación de uno u otro mecanismo; así como, a determinar la contribución específica del tejido cromafín.

Patrocinado parcialmente por el proyecto G101-7221: FROVIT-CEA/CONICYT.

ORGANIFICACION DE YODO POR Periplaneta americana II. CARACTERIZACION PARCIAL DE MOLECULAS LIBRES RADIOYODADAS. Organy Delhuesa Héctor*, Navarro Luz, Arribas Carlos y Valverde-R. Carlos. Departamento de Fisiología y Departamento de Biología Molecular. Instituto de Investigaciones Biotécnicas. UNAM.

Introducción. En los invertebrados y en los insectos en particular se ha demostrado acumulación y organificación de yodo en las estructuras escleroproteicas que forman parte del exoesqueleto. Lo hidrolítico de este material mostró la presencia de yodotirocinas; mientras que análisis similares de tejido parenquimatoso revelaron la presencia de yodotirocinas (J Exp Zool 135: 19, 1957). El posible papel fisiológico de estas moléculas en los invertebrados no se ha estudiado de manera sistemática (Ann N Y Acad Sci 50: 283, 1949). El presente trabajo se diseñó con el propósito de analizar la presencia de moléculas yodadas libres en insectos, ya que este hecho podría interpretarse como sugestivo de su probable función como mensajeros intercelulares.

Materiales y Métodos. Individuos adultos de *P. americana* fueron inyectados con 125 I. Los animales se sacrificaron a distintos tiempos y su tejido parenquimatoso se homogeneizó en 0.05% CaCl₂ 0.02 N GLI-NaOH, pH 9.6. Los homogenatos de cada animal se deslipidizaron mediante dos extracciones sucesivas con cloroformo. Posteriormente, el pH de los sobrenadantes acuoso se ajustó a 4 y se extrajeron dos veces con acetato de etilo:butanol (9:1; v/v). Las fases orgánicas se concentraron, se reprecipitaron en etanol:ácido (2 M) (1:1) y se cromatografiaron en placa fina de sílica gel utilizando cloroformo:metanol:ácido (100:50:5). Las placas se recortaron en tiras de 0.5 cm para contarse en un espectrómetro gamma. Como estándares se utilizaron: diyodotirocinas; triyodotirocinas; triyodotirocinina reversa; tirocinas; 3,5 diyodotirocinina y 125 I.

Resultados. Los radiocromatogramas de extractos de tejido parenquimatoso muestran regularmente un "pico" principal con un Rf de 0.437 (n= 10 individuos; 14 cromatografías), valor que no corresponde al de ninguno de los estándares mencionados. Este material se extrae mejor a pH 4 que a pH 9. La eficiencia de extracción fue: butanol > acetato de etilo (1:1) > acetato de etilo:butanol (9:1) > acetato de etilo:éter. Obsérvese que disminuye la extracción al disminuir la polaridad del solvente. Sin embargo, a juzgar por la resolución en el sistema cromatográfico empleado, la extracción con acetato de etilo aunque de menor eficiencia, es más selectiva para el material aislado. En contraste, el material del extracto butanólico es más heterogéneo y no se resuelve en el sistema cromatográfico utilizado. En extractos de hemolinfa se identifica un material circulante con un Rf idéntico.

Discusión y Conclusiones. Hasta donde sabemos, éste es el primer trabajo en el que sin someter a hidrólisis el material por analizar, se informa la presencia de moléculas radioyodadas en invertebrados. Los resultados muestran que en los extractos de tejido parenquimatoso de *P. americana* es posible aislar al menos una molécula yodada libre. La presencia de este material en los extractos de hemolinfa sugiere que se trata de una(s) molécula(s) circulante(s). Por otra parte, el análisis de los resultados obtenidos al extraer con distintos solventes podría llevar a optimizar la extracción y obtener el material en forma homogénea y en una cantidad razonable. Los resultados del presente trabajo confirman y amplían los estudios previos acerca de la organificación de yodo en los insectos, e indican la necesidad de analizar la naturaleza química y posible papel fisiológico de estas compuestas. Actualmente se realizan en el laboratorio estudios orientados a este propósito.

Patrocinado en parte con el donativo GI01-7723; PRCyt-CEA/Cuba/CYT.

6.2.4.3



Program Abstracts



73rd Annual Meeting

■
June 19-22, 1991

■
Sheraton Hotel
Washington, D.C.



THE
ENDOCRINE
SOCIETY

PROMOTING ESTROGEN BIOSYNTHESIS: THE UTILIZATION OF TISSUE SPECIFIC PROMOTERS OF AROMATASE CYTOCHROME P450 GENE EXPRESSION

Q.D. Alcorn, C.P. Gagnier, and M.W. Kilgus (SPON: J.M. Burns) Green Cell, Inc. Rept. Biol. Sci. and Depts. Obstet. and Gynecol., UT Southwestern, Dallas, TX 75235
The formation of estrogens from C19 steroids is catalyzed by a specific form of cytochrome P450, aromatase cytochrome P450 (P450arom), the product of the CYP19 gene. Previous studies have demonstrated that aromatase activity in human adipose and ovarian granulosa cells is subject to complex, multifactorial regulation and that changes in activity are correlated with changes in the levels of mRNA encoding P450arom. We have previously isolated the gene encoding P450arom. Two unique untranslated first exons (exons I1 and I2) have been identified in mRNA specific for P450arom in human placenta, although the proportion of transcripts encoding exon I2 is very small. Genomic clones encoding the sequences of exons I1 and I2 have recently been isolated. In addition to the promoters for these two exons, sequence analysis of the DNA immediately 5' of exon II (containing the start site of translation) suggest the presence of yet another putative promoter (promoter II) beginning 100 bp 5' of the sequence which serves as a splice junction in placenta. Analysis of the tissue-specific utilization of these promoters was accomplished by means of the polymerase chain reaction (PCR) to amplify specific fragments from mRNA templates. In addition to placenta, HCG-3 cells, hydralid moles and fetal liver appear to utilize promoter I1 and, to a very limited extent, promoter I2. The corpus luteum of human ovary differs in that promoters I1 and I2 are completely inactive. Using a combination of primer extension and S1 nuclease protection analysis, it appears that the expression of P450arom-specific mRNAs in corpus luteum is regulated by promoter II, directly upstream of the start of translation. Northern analysis of poly A+ RNA isolated from placenta and corpus lutea demonstrates that the major promoter of placental P450arom is promoter I1, while the major promoter in the corpus luteum is promoter II. The presence of a third untranslated exon may be postulated to be responsible for a minor portion of the transcripts in the ovary, based on the observation that there is an S1 protected fragment of a size consistent with the placental splice junction. One may propose that the ovarian P450arom promoter is the ancestral promoter. This is consistent with its location proximal to the start of translation, which is the most common site of promoter localization. When, in the course of evolution, the human placenta developed the ability to express P450arom, this promoter was not utilized, and its role was taken over by promoter I1 (and I2). These latter sequences may serve a role as fetal promoters, and therefore, be subject to developmental regulation.

5-DIODINASE IN COMPLEX, DEFICIENTLY EXPRESSED AND REGULATED BY RESPONSE TO DEFICIENCY DURING T3 ADMINISTRATION

M. Saito, S.A. Dubral*, and L.L. Leopold. Molecular Endocrinology Laboratory, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01655.
Liver 5'D-I and brain 5'D-II activities are decreased in rats fed a selenium (Se) deficient diet (Biochem. J. 259:357, 1989), suggesting that both enzymes are Se dependent proteins. Subsequently, 5'D-I has been shown to be a selenoprotein (Behne et al. BBRC 161:389, 1989). Since serum T3 concentrations are twice normal in the Se deficient animals, it is unclear whether the Se deficiency or the increased T3 concentrations account for the decrease in brain 5'D-II. In order to separate these two possibilities, the effects of Se on 5'D-I in cAMP stimulated glial cells (5'D-II) and LLC-PK1 cells (5'D-I) were examined. LLC-PK1 and glial cells were grown in the absence or presence of increasing concentrations of Se (0, 1 pM, 10 nM and 40 nM) in DMEM-F12 medium for 3-5 days or in medium containing serum 1Se for 24 hours. 5'D-I and 5'D-II activities were determined by quantification of the Bract124T3 affinity labeled 5'D-substrate binding subunit (5'D-SBS). Affinity labeled and 35S labeled proteins were analyzed by SDS-PAGE with subsequent radioimaging of the dried gels. Se deficiency was confirmed by measuring the activity of the selenoprotein glutathione peroxidase (GPx) using the coupled-peroxidase reaction. Data is expressed as the % of values obtained in cells grown in 40 nM Se.
Table:
GliaL: 5'D-SBS GPs (1, 11, 11, 91, 100) vs 5'D-II GPs (1, 13, 35, 64, 50, 111, 100)
LLC-PK1: 5'D-SBS GPs (1, 13, 35, 64, 50, 111, 100)

TYPE II 5'D-DEIODINASE IS NOT A SELENOPROTEIN

M. Saito, S.A. Dubral*, and L.L. Leopold. Molecular Endocrinology Laboratory, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01655.
Liver 5'D-I and brain 5'D-II activities are decreased in rats fed a selenium (Se) deficient diet (Biochem. J. 259:357, 1989), suggesting that both enzymes are Se dependent proteins. Subsequently, 5'D-I has been shown to be a selenoprotein (Behne et al. BBRC 161:389, 1989). Since serum T3 concentrations are twice normal in the Se deficient animals, it is unclear whether the Se deficiency or the increased T3 concentrations account for the decrease in brain 5'D-II. In order to separate these two possibilities, the effects of Se on 5'D-I in cAMP stimulated glial cells (5'D-II) and LLC-PK1 cells (5'D-I) were examined. LLC-PK1 and glial cells were grown in the absence or presence of increasing concentrations of Se (0, 1 pM, 10 nM and 40 nM) in DMEM-F12 medium for 3-5 days or in medium containing serum 1Se for 24 hours. 5'D-I and 5'D-II activities were determined by quantification of the Bract124T3 affinity labeled 5'D-substrate binding subunit (5'D-SBS). Affinity labeled and 35S labeled proteins were analyzed by SDS-PAGE with subsequent radioimaging of the dried gels. Se deficiency was confirmed by measuring the activity of the selenoprotein glutathione peroxidase (GPx) using the coupled-peroxidase reaction. Data is expressed as the % of values obtained in cells grown in 40 nM Se.

Table with 2 columns: GliaL and LLC-PK1. Rows show 5'D-SBS GPs and 5'D-II GPs at various Se concentrations (1, 11, 11, 91, 100).

% caused a dose dependent increase in GPs activity in both cell types and in type I 5'D-SBS from LLC-PK cells, but no effect on glial cell type II 5'D-SBS. LLC-PK cells contained multiple 35S labeled proteins including the 27 kDa 5'D-SBS. GliaL cells contained 6 35S labeled proteins of M = 54.4, 47.3, 20.3, 17.1, 15, 12.1 kDa, none of which corresponded to the type II 5'D-SBS. These data show that, unlike 5'D-I, 5'D-II does not contain a selenocysteine or selenomethionine, further demonstrating that the two enzymes are unique.

SELENIUM REGULATES EXPRESSION OF TYPE I 5'D-DEIODINASE ACTIVITY IN THE PORCINE KIDNEY CELL LINE LLC-PK1

M. Gierczak, R.D. Heggen, H. Rogas*, J. Kobuszewski (SPON: I. Schuster) Abt. Klinische Endokrinologie, Medizinische Hochschule Hannover, D-3000 Hannover 61, Henning-Behn-Gmh. + D 1000 Berlin 42, FRG
The effect of selenium depletion on Type I 5'-deiodinase (5-D-I) activity was evaluated in LLC-PK1 cells, an established porcine kidney tumor celline expressing high 5'-D-I levels. We recently identified the 27 kDa substrate binding subunit of rat liver 5-D-I as a selenoprotein (Behne et al. BBRC 123:1143,1990). 5-D-I catalyzes the systemic production of the active thyroid hormone T3 from circulating T4. The cells were maintained and passaged in a serum free DMEM-F12 medium containing T3, insulin, transferrin, vasopressin, hydrocortisone, cholesterol and sodium selenite. ~5x10^6 cells/cm^2 were plated in 24 well plates with variable amounts of SeO3^2-. 5-D-I activity was measured with a radio release assay from 125I-T3 using intact cells 4 days after splitting with the cells still subconfluent. Under serum-free culture conditions 5-D-I activity reaches levels comparably high to those in presence of 5% serum. 5-D-I activity increased proportionally to the SeO3^2- concentration in the culture medium. Minimal activity could be detected with 0.5 nM SeO3^2- reaching a plateau at 10 nM SeO3^2-. 5-D-I content of cells was quantified by affinity labeling intact cells with 125I-Bract4, a specific affinity ligand for the 27 kDa 5-D-I subunit. The 5-D-I 27 kDa subunit was not detectable after SDS Page of the cell lysates when less than 1 nM SeO3^2- was present in the culture medium; plateau levels were also reached at 10 nM SeO3^2-. Bract4 typically labels, without being competed by substrates and analogues, also a 30 and 55 kDa protein. The 55 kDa protein maintained almost equal expression levels under all culture conditions whereas the 30 kDa protein with yet unknown function showed also a selenium dependent expression. Selenium deficiency prevents the expression of the 5-D-I enzyme and at subcritical concentrations may thus impair thyroid hormone action. Selenium deficiency is perhaps involved in disorders of thyroid hormone metabolism such as the low T3 syndrome.



SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA, A. C.



XVII CONGRESO NACIONAL

6 a 11 de NOVIEMBRE DE 1988. OAXACA, OAX.

ACCIONES TERAPÉUTICAS DE LA TAURINA Y LA VITAMINA-E EN PACIENTES CON LEUCODERMIA PIGMENTARIA.
 O. Quintana, E. Pasmantas-Nájera, H. Orlóriz M. De Bagill y C. Méndez. Instituto de Fisiología Celular, Instituto de Química, UNAM y Asociación Para Evitar la Ceguera.
 La leucodermia pigmentaria (LP) es una enfermedad hereditaria en donde ocurre una degeneración progresiva de los fotoreceptores (FR) que conduce a la ceguera y para la cual, hasta el presente no se cuenta con algún tratamiento para combatirla. Por otra parte, existe evidencia experimental que indica que la taurina y la Vit-E, compuestos menos de la retina, previenen la desestabilización celular en FR en una variedad de modelos degenerativos. El presente trabajo reporta los primeros resultados obtenidos en 40 pacientes con LP sometidos a un tratamiento con taurina y Vit-E (1 y 0.8 g/día, respectivamente) durante 6 meses y hasta 2 años.
 En el aspecto clínico, se ha observado que en el 61% de los pacientes sus campos visuales no han disminuido, mientras que en el resto la degeneración ha progresado. Se ha observado mejoría en la agudeza visual en 74% del grupo, 13% ha perdido agudeza y 11% permanece sin cambios. Paralelamente al seguimiento clínico de los pacientes, se realizaron estudios de sensibilidad a la luz celular y composición de ácidos grasos de eritrocitos. El comportamiento litico de eritrocitos de pacientes resultó normal así como la abundancia y composición de los ácidos grasos mayoritarios, sin embargo, se detectaron modificaciones en algunos compuestos minoritarios, los cuales en ciertos casos, se corrigieron por el tratamiento.

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE UN NUEVO LIPOCALCIN PARA PRODUCCION DE LAS UNIDADES LIPOCALCICAS EN PHARLAPASTES H-1146.
 P. Ferrer, A. González-Nájera y H. Céspedes. Unidad de Química de la Nutrición, IITA, UNAM. Departamento de Química Analítica Facultad de Ciencias Químicas de UNAM, México D.F., México D.F., CDMX.

El transporte y la segregación lipocalcica de unidades lipocalcicas (LPC) de dos receptores diferentes (T155 y 450) que muestran resultados de sustrato-afinidad presente en este tipo de glicoproteínas. Aunque estos tipos de receptores están presentes en la membrana citoplásmica de varios tipos celulares, únicamente el receptor T155 es capaz de internalizar y transportar a lipocalcina. Los enzimas lipocalcicos que han sido caracterizados y que contienen el sustrato lipocalcico. Actualmente, hemos encontrado en nuestro laboratorio un nuevo sustrato para internalizar y transportar a lipocalcina, enzimas lipocalcicas en fibroblastos humanos en cultivo. Este sustrato es diferente e independiente del sustrato que reconoce a enzimas lipocalcicas un sustrato que está localizado en un dominio diferente al que se encuentra el sustrato de sustrato-afinidad. Hemos purificado este sustrato y iniciado su caracterización. Los resultados hasta ahora obtenidos por diversos métodos espectroscópicos (I.R., R.F., R.L.) de lipocalcina de (Homo) indican un contenido de peso molecular 121 daltons y una estructura de tipo globular, que no corresponde con los datos antes conocidos.

Este trabajo ha sido apoyado en parte por CONACYT PASC-026/84.

Optimización de la vía por hemiplaques sintéticas. III Purificación y caracterización parcial de moléculas libres y asociadas.
 H. Gómez, I. Hernández, C. Arredondo, C. Valdez, Departamento de Fisiología y de Biología Molecular III, UNAM, México D. CDMX.
 En interneurales y en interneuronas, en particular, se ha demostrado la acumulación y organización de yodo en estructuras electroplásmicas del conaxón, que facilitaría mayor la presencia de yodo y neurotransmisión (NT) y NT, mediante que el tejido parasintáptico (PS) se detectan polimeros (T₁ y T₂). En el presente trabajo se muestran evidencias de la existencia de moléculas polímeros libres y asociadas en interneuronas, hecho que puede ser sugerente de su probable función como otras moléculas, (L₁ y L₂) entidades solútes de E. intermedio, (L₁ y L₂) y modificadas (L₁ de los demás). Se diseñó el T₁ y mediante una nueva (en hidróxido y que no extra-lipídica) optimización para purificar T₁, T₂ y sus moléculas, el material radiactivo se analizó mediante T₁ (T₁ y T₂) y Gammaprecipitación en fase (G). En el sustrato de los componentes (T₁) principal cuando R₁ G₁ G₂ fue mejor al T₁ y el otro que R₁ de G₁ G₂. A los valores se corresponden a los de T₁, T₂ y T₃ Se realizaron otros experimentos el T₁ principal con R₁ G₁ G₂ fue mejor el de tener la primera interacción. El R₁ del T₁ principal ha de ser el centro de T₁. En estructuras de hemiplaques se identificaron los mismos componentes en estas estructuras. Este resultado muestra la presencia de moléculas polímeros libres en estructuras de T₁ y T₂ sintéticas, muestra que cuando en la hemiplaques se requiere presencia a naturaleza química y papel fisiológico. Internacionalmente por el término G₁-G₂-T₁-T₂-T₃-T₄.

CAMBIO RAPIDO EN EL METABOLISMO NITROGENADO PROVOCADOS POR ESTRÉS SALINO E HIDRICO EN AMARANTO.
 A. Guitiérrez de Ben, E. Murillo. Departamento de Bioquímica, UNF, Facultad de Química, UNAM, 04510 México, D.F.

Las concentraciones de amoníaco y de aminoácidos y las actividades enzimáticas de la glutamina sintetasa (GS) y glutamo dehidrogenasa (GDH) pueden cambiar en respuesta a un estrés ya sea hídrico o salino. En general, estos cambios en el metabolismo nitrogenado han sido determinados en períodos relativamente largos. En este trabajo reportamos que es posible detectar estos cambios en tiempos más cortos utilizando explantes colocados directamente en la solución que causa el estrés. En explantes y plantas de *Amaranthus hypochondriacus*, el estrés hídrico causa cambios en las concentraciones de amoníaco y glutamato y en la actividad de GS mientras que los niveles de aminoácidos totales y la actividad de GDH no se altera. Se determinó que esta respuesta depende principalmente del contenido relativo de agua (CRA) que expresa el valor de la pérdida de agua. Los incrementos en los niveles de amoníaco y en la actividad de GS se encuentran en un intervalo definido de la CRA. Los valores del intervalo se observaron a diferentes condiciones que alteran la velocidad de pérdida de agua. Por otro lado, el calcio añadido a las condiciones de estrés disminuyó la velocidad de la pérdida de agua pero no alteró la respuesta bioquímica en función del CRA. Concluimos que las plantas tienen la capacidad de una respuesta rápida a cambios en el volumen celular provocados por la pérdida de agua.

INFLUENCIA DEL ESTRÉS HIDRICO SOBRE EL CONTENIDO DE BETACIANINA EN AMARANTO. H. Letechipia, H. J. Velázquez, E. Murillo. Departamento de Bioquímica, UNF, Facultad de Química, UNAM.
 Las betacianinas son glucósidos que dan coloraciones rojo violeta a las plantas; su función se desconoce. El ácido de estos compuestos es la betanidina, la cual se deriva de la tirosina. En el caso del Amaranth, la betanidina tiene como azúcar el radical ácido glucosídico glucosídico. Se ha reportado que la biosíntesis de las betacianinas puede ser inducida por citoquininas en oscuridad, o por luz vía fitocromo. Por otro lado, se ha reportado que el estrés hídrico induce la acumulación de algunos productos secundarios. En nuestro laboratorio encontramos que en plantas adultas el estrés hídrico estimula la acumulación de betacianina. Este trabajo está diseñado para determinar a que nivel ocurre el estrés hídrico sobre los niveles de betacianina. En plantas adultas en hidróxido, demostramos que el estrés hídrico no influye en la inducción del sistema de síntesis de betacianina, sino que ésta modifica sus contenidos quizá a través de la acción de la acumulación de glicinas betaina.

MODIFICACION DEL PERFIL DE POLIAMINAS POR INDUCTORES FUNGICOS EN CULTIVOS *in vitro* DE RAICES TRANSFORMADAS DE Datura stramonium.
 Y.M. Lopez-Varela, F. Coscova, C. Quintero y T. Avoro. División de Biología Vegetal, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Los hongos, al infectar una planta, inducen una serie de cambios metabólicos, entre ellos la síntesis de metabolitos secundarios. *D. stramonium*, una planta de la familia de las Solanaceas, produce dos alcaloides de tipo indol del tipo indol: la hiosciamina y la scopolamina uno de cuyos precursores, la ornitina, también es precursor de las poliaminas. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar, si la infección con hongos del tipo *Aspergillus nidulans* modificó el metabolismo de las poliaminas en raíces obtenidas mediante transformación con *A. niger*. Después de 24 h de infección las 3 poliaminas, putrescina, espermidina y espermina, disminuyen hasta el 25%, 44.6% y 22.3% respectivamente. Esta disminución depende del tiempo, la hiosciamina y la scopolamina no de cuyos precursores, la ornitina, también es precursor de las poliaminas. Después de 24 h de infección las 3 poliaminas, putrescina, espermidina y espermina, disminuyen hasta el 25%, 44.6% y 22.3% respectivamente. Esta disminución depende del tiempo, la hiosciamina y la scopolamina no de cuyos precursores, la ornitina, también es precursor de las poliaminas. Después de 24 h de infección las 3 poliaminas, putrescina, espermidina y espermina, disminuyen hasta el 25%, 44.6% y 22.3% respectivamente. Esta disminución depende del tiempo, la hiosciamina y la scopolamina no de cuyos precursores, la ornitina, también es precursor de las poliaminas. Después de 24 h de infección las 3 poliaminas, putrescina, espermidina y espermina, disminuyen hasta el 25%, 44.6% y 22.3% respectivamente. Esta disminución depende del tiempo, la hiosciamina y la scopolamina no de cuyos precursores, la ornitina, también es precursor de las poliaminas.

6.2.9.6
46.2.9.7

Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas



XXXIV
Congreso Nacional de
Ciencias Fisiológicas

Programa general
y resúmenes



UNIVERSIDAD DE COLIMA

Colima, Col., septiembre 8 al 12

1991

REGULACION DIFERENCIAL DEL EPIDIDIMO. EFECTOS DE LOS ESTRADIÓGENOS SOBRE LA MADURACION DEL EPIDIDIMOTOCITO. FONSECA TERESA* (Avalada por Valverde Carlos), Bruze Yvonne*, Hosado Amorita. Laboratorio de Diferenciación Celular, Depto. de Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa.

La fertilización requiere de la maduración fisiológica del espermatozoide. Este proceso implica la adquisición de una vigorosa motilidad progresiva, la capacidad de reconocimiento del óvulo a través de un receptor específico y cambios morfológicos que posibilitan el desarrollo de la reacción acrosomal y la liberación de enzimas hidrolíticas que permiten la penetración de la zona espermiática al citoplasma del óvulo.

La maduración del espermatozoide se lleva a cabo principalmente en el epidídimo, anatómicamente dividido en cabeza, cuerpo y cola.

El objetivo de este trabajo es demostrar la posible regulación, endocrina independiente en cada uno de los segmentos epididimarios.

Para esto, se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, con implantes subcutáneos de Estradiol de 1, 5 y 7 mg capaces de liberar continuamente 3 cantidades diferentes de estradiol durante 6 y 12 semanas. A los tiempos especificados se sacrificaron los animales y se obtuvieron los espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo. A cada uno de estos fueron de ser determinados el % de motilidad progresiva y susceptibilidad de la desorganización nuclear al ser tratados con Daziril sulfato de sodio y distictetil.

El % de espermatozoides móviles disminuyó significativamente en la cola (de 45 a 20%) que en el cuerpo (de 45 a 15%) y en la cabeza (de 45 a 10%). El mismo efecto se apreció en el % de espermatozoides con motilidad progresiva, aunque en este caso la diferencia inicial (14.9% en la cabeza y 48.7% en la cola) se redujo (15.6% contra 5.9%). La susceptibilidad a la desorganización de los espermatozoides obtenidos de cola sólo se vio afectada por la dosis máxima de estradiol (7mg) disminuyendo del 62 al 54%. En el caso de los espermatozoides de cabeza, los 3 dosis de estradiol indujeron una disminución que sólo fue significativa en el caso de la dosis mínima (1mg).

Nuestros resultados indican que la adquisición de la capacidad de motilidad progresiva del espermatozoide, así como de su resistencia a la desorganización por medio experimental, fue diferencialmente afectada por el tratamiento hormonal, el cual parece alterar fundamentalmente el funcionamiento de la cola del epidídimo.

RECAMBIO DE NORADELALINA Y ADRENALINA HEPATICAS EN RATAS ALIMENTADAS AD LIBITUM Y EN AYUNO DE 16 HORAS. EN LILIE S. Racotta*, Luz Navarro* y Radu Racotta*. Depto. de Fisiol. Exp. Mal. Cienc. Biol., IPN e Inst. Invest. Bioméd., UNAM.

En un trabajo previo se observó que los niveles hepáticos de noreadrenalina (NA), más no los de adrenalina (A), son mayores en ratas ayunadas comparado con ratas alimentadas. Los resultados fueron interpretados como una disminución de la actividad simpática hepática por efecto del ayuno. Sin embargo, se sabe que los niveles intraneuronales de NA tienden a permanecer constantes, dado que el aumento de la secreción se compensa por un aumento de la síntesis, por lo cual se emplea preferentemente la medición de la tasa de recambio mediante el bloqueo de la síntesis. En el presente trabajo se compararon los niveles hepáticos de NA y A (HPLC, detección electroquímica) en presencia y ausencia de un bloqueador de la síntesis, la alfa-metil-Paratirosina (AMPT, 150 mg/kg i.p.), en ratas alimentadas y ayunadas. La AMPT disminuyó los niveles hepáticos de NA en un 23% ($p < 0.05$) en ratas alimentadas, pero sólo en un 15% (NS) en ratas ayunadas. Por otro lado, los niveles hepáticos de NA en las ratas ayunadas con respecto a las alimentadas fueron 18% (NS) y 29% ($p < 0.05$) mayores en ausencia y presencia de AMPT, respectivamente. En conjunto estos datos indican que el recambio de NA es menor en ayunas, sugiriendo una actividad simpática disminuida en esta condición. Con respecto a la A, se observó una disminución significativa (29%, $p = 0.05$) por efecto de la AMPT, sólo en las ratas alimentadas. Esto, además de indicar síntesis de A propia en el hígado, sugeriría que la tasa de síntesis y secreción de A, al igual que la de NA, es menor en el ayuno. Los resultados apoyan la existencia de una relación entre la actividad simpato-cromafín del hígado y el estado de alimentación, relación que puede tener importancia en el balance energético del organismo. Tanto de punto de vista del control del metabolismo hepático como del de la ingesta de alimento.

* Becario de DEDICT-COFFA, IPN
Trabajo apoyado por el proyecto DEPI-IPN 901768.

PARTICIPACION DEL CALCIO EN EL EFECTO INHIBITORIO DE LA ALOXANA SOBRE EL TRANSPORTE DE SODIO EN LA PIEL DE RANA PIFIENS. Soto C., Reyes J.L., Pérez R., Pérez C*. Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, C.U.NEVEZ, Depto. de Sistemas Biológicos UAM-Xochimilco.

La aloxana es uno de los compuestos más utilizados para producir diabetes mellitus experimental. Dunn en 1942 reportó que la aloxana produce necrosis de las células del páncreas. No se ha establecido con certeza el mecanismo de acción farmacológica. Una característica importante de la aloxana es su gran afinidad por los grupos tiol, con los que reacciona reversible e irreversiblemente. La modificación de estos grupos se ha relacionado con la alteración de la homeostasis del Ca. Esta alteración se ha vinculado con la necrosis celular causada por agentes tóxicos. En un trabajo previo reportamos que la aloxana produce una disminución en la corriente de sodio, lo que sugiere un efecto inhibitorio sobre la actividad de la ATPasas (Na⁺). El efecto de la aloxana sobre la ATPasa de Na⁺ y de Ca²⁺ sugieren una interacción de la aloxana con sistemas de transporte membranal de iones, lo que puede resultar en la modificación de la homeostasis celular. En este trabajo el objetivo fue estudiar la participación del Ca²⁺ en el efecto inhibitorio de la aloxana sobre el transporte de sodio al alterar la homeostasis de este ión. Se utilizó como modelo el transporte de sodio y potasio de sodio a la piel aislada de Rana pifiens montada en cámaras de tipo Ussing. Se probaron los siguientes compuestos: nifedipina (5 μM), diltiazem (5 μM) (inhibidores de la entrada de Ca²⁺) y el ionóforo de Ca²⁺ A23167 (50 μM). Estos compuestos se administraron del lado no-osc de la piel. Se observó que la nifedipina no modificó el efecto inhibitorio de la aloxana sobre el transporte de sodio. El diltiazem aumentó el efecto de la aloxana, es decir, que produjo una mayor inhibición. En contraste, el ionóforo de Ca²⁺ eliminó el efecto producido por la aloxana, esto es, que aumentó el transporte de sodio. Los resultados anteriores sugieren que el calcio participa en la respuesta de la piel aislada de rana a la aloxana.

REMISIÓN DE DIABETES EN RATAS TRATADAS CON PIRROFOSFATO DE TIAMINA G. COCAREZOVILASA ESTABLE EN SOLUCIÓN. Alcázar Leyva, S. (Avalada por Luán Estrada, M.), Bonilla Núñez, M. y Benítez Rodríguez, M.I. Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, *Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco.

Con objeto de comprobar el papel que desempeña el Pirrofosfato de Tiamina (PPT) o Cocarboxilasa en la regulación de la glucemia se diseñó un modelo experimental con ratas Wistar machos de 250 gr de peso, que se dividieron en 4 lotes de 6 ratas cada uno: 2 experimentales (A, B, C y D), el lote A recibió 1 ml diario de Estreptozotocina (STZ) a una concentración de 30 mg/kg, disuelta en amortiguador de citratos de pH 4.4 durante 5 días. Al comprobarse la hiperglucemia provocada (superior a 200 mg/dl), se aplicó PPT Cocarboxilasa estable en solución a una dosis de 1 ml diario (40 mg/ml) vía subdérmica durante 15 días. El lote B se trató de la misma forma que el lote A, sólo que la aplicación del PPT se inició una semana después del establecimiento de la hiperglucemia. Al lote C se le aplicó el amortiguador de citratos en que se disuelve la STZ (1 ml diario subdérmico). El lote D se utilizó como testigo. Los 4 lotes recibieron alimento balanceado y agua ad libitum. Diariamente se determinó el peso corporal, el peso, el consumo de agua, el consumo de alimento, la glucosa sérica y glucosa en orina.

Los resultados muestran que las ratas tratadas con PPT inmediatamente después de la inducción de la hiperglucemia, gradualmente se van acercando los niveles séricos de glucosa a lo normal y se mantienen así después del tratamiento por 15 días con PPT; se con sidera remisión debido a que desaparece la poliuria, polifuria y por ende ganan peso también gradualmente. Los resultados del lote B muestran que la normalización de la glucemia depende de la presencia continua del PPT, ya que aparentemente pierden la capacidad de autorregulación definitiva, ya que, en cuando se dejó de aplicar el PPT, los niveles de glucosa aumentaron nuevamente.

Se concluye que la aplicación temprana del PPT en este modelo experimental, permite que se recupere la capacidad de autorregulación de la glucemia, lo cual se ha observado también a nivel clínico. Es de suponerse que existe una recuperación funcional de los islotes pancreáticos a pesar de haber llegado al estado de necrosis inducida por la STZ. Este efecto reversible no se ha reportado por ningún otro método.

DIFFERENTIAL DISTRIBUTION OF PURINE DEGRADATIVE PATHWAYS BETWEEN GLIAL AND NEURONAL CELLS IN CULTURE. G. CEBALLOS, R. RUBIO, and J. LITTLE, Dept. of Physiology, Univ. of Virginia, Charlottesville, VA., 22908.

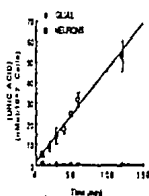
Evidence indicates that degradation of adenosine (ADO) in nervous tissues occurs preferentially in glia and not in neurons. To demonstrate that is the case we have performed studies in cultured embryonic chick CNS glia and cultured neuronal cells from ciliary ganglia.

Cells were incubated in Krebs-Henseleit solution containing saturating concentrations (10^{-4} M) of the exogenous substrate for each degradative enzyme: Adenosine (ADO) for adenosine deaminase (ADA), inosine (IHO) for nucleoside phosphorylase (NP) and hypoxanthine (HYP) for xanthine oxidase (XO). The rate of accumulation of the products of each of these enzymatic reactions were evaluated by HPLC. Accumulation in the media ($\text{fmoles}/10^7$ cells) of: (INO) + (HYP) = (UA) measured ADA, accumulation of HYP + UA measured NP and accumulation of UA measured XO.

The results for XO activity are shown in the figure. As shown the accumulation of UA in the bathing medium is not time and is greater in glia than in neurons cultures. These results indicate that XO is preferentially found in glial cells, while in the neuronal cultures is almost absent. A similar difference between glial and neuronal cultures was found for ADA and for NP.

These results demonstrate that there is a preferential distribution of purine degradative pathways in glial cells. In addition our results also demonstrate, for the first time, the presence of XO in glial cells.

Supported by Nat. Inst. of Cardiol. Mex., IPN, School of Med., Mex. and focusing giving grant Johnson & Johnson.



PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE SUBPOBLACIONES DE GRANULOS CRONIFILICOS DE MEMBRANA ADRENAL. Gómez, J.C., Ferriz, Navarro, L.M., Chávez, O.* y Martínez, M. Muñiz, D. Depto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV-IPN, Unidad de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Guadalajara, Jalisco, Instituto de Investigaciones Biomédicas del UNAM, México, D. F.

En la médula adrenal existen dos clases de células que se diferencian morfológicamente por el tipo de gránulos que presentan. Se ha sugerido que tal diferencia se debe a que hay gránulos que almacenan adrenalina y otros noradrenalina. Además, la presencia de acetilcolinesterasa (AChE) en los gránulos crónifílicos ha sido muy controvertida por mucho tiempo y se cree que esta enzima se localiza en un tipo especial de gránulos. El objetivo de este trabajo fue implementar un método para el aislamiento de varias poblaciones de gránulos crónifílicos adrenales de bovino. El procedimiento consistió de dos fases (ambas bajo condiciones isotónicas): separación de las fracciones granular y mitocondrial en un gradiente continuo de Percoll (Grattell, et al., 1981) y purificación de subpoblaciones granulares en un gradiente discontinuo de Percoll. La cuantificación de los marcadores bioquímicos se realizó por métodos convencionales.

El análisis cuantitativo de seis fracciones indica que cinco de ellas contienen gránulos crónifílicos prácticamente libres de contaminación con mitocondrias. Las fracciones más densas (que se equilibran al 30-nM de Percoll) son enriquecidas en noradrenalina mientras que la adrenalina se concentra en fracciones menos densas (10-50% de Percoll). Otras fracciones presentaron gran actividad de dopamina β -hidroxilasa que, al igual que la catecolaminas, son marcadores específicos de gránulos crónifílicos. La concentración específica de adrenalina y noradrenalina en las subpoblaciones granulares fue más alta que para la población granular total.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo confirman la existencia de AChE en todas las subpoblaciones de gránulos crónifílicos.

* Analytical Biochemistry, 112: 118-124, 1984.

DEFICIENCIA DE TAURINA EN ASTROCITOS Y NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO EN CULTIVO. Julio Moran* y Hermilina Pasantes-Morales, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F.

La deficiencia de taurina en gatos y roedores lleva a una degeneración severa de la retina. En gatos deficientes los niveles de taurina bajan hasta 80% con una dieta prolongada sin taurina. Los roedores, sin embargo, pueden sintetizar taurina por lo que la máxima reducción puede ser hasta del 40% cuando se tratan con guanidino etanosulfonato (GES), un bloqueador competitivo del transporte de taurina. La deficiencia de taurina en gatos también causa marcadas alteraciones en el desarrollo del cerebro. Los gatos nacidos de madres deficientes en taurina muestran un retraso en la migración de las células granulares del cerebelo y neuronas corticales (Skurman, Prog. Clin. Biol. Res. 35:359, 1990). Los mecanismos responsables de estas alteraciones se desconocen. En este trabajo se describe un modelo *in vitro* para conseguir una reducción rápida y marcada de taurina en células granulares y astrocitos de cerebelo de rata como un modelo *in vitro* para el estudio de las alteraciones inducidas por una deficiencia de taurina. Las células granulares y astrocitos crecidos en presencia de GES (2 nM) mostraron una progresiva y rápida disminución en el contenido de taurina. En astrocitos se observó una reducción del 35% del aminoácido después de 1 h de tratamiento con GES y esta reducción continuó hasta que los niveles de taurina alcanzaron 90% del control después de 24 h. Este remanente de taurina persistió sin cambio por tiempos largos de exposición al GES (3 semanas). En neuronas la depleción fue similar, aunque más lenta, alcanzándose el máximo de reducción a las 48 h. La acción del GES fue específica para la taurina ya que ninguno de los otros aminoácidos libres se modificó. La viabilidad celular medida por liberación de LDH al medio fue similar a los controles durante el tratamiento con GES. La captura de taurina en ambos tipos celulares se inhibió completamente (96-98%) en presencia de GES (2nM). Esta sugiere que la poza de taurina en ambas células depende enteramente de taurina endógena. Esta aproximación experimental rápida permitirá examinar los efectos de una deficiencia marcada de taurina en roedores como un modelo útil para investigar las anomalías asociadas a la deficiencia de taurina.

Financiado parcialmente por DGAPA, UNAM (IN-0245391).

LIBERACION DE AMINOACIDOS ENDOGENOS ESTIMULADA POR SOLUCIONES HIPOSMOTICAS EN REFINADOS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA. C.M. Lopez, R. Sánchez, Olaya y Pasantes-Morales, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

La mayoría de las células animales presentan la capacidad de regular su volumen en condiciones anisomóticas. En soluciones hiposmóticas se observa un aumento del grado en el volumen celular seguido de un fase de regulación más lenta durante la cual se alcanza un valor muy cercano al volumen inicial. Este proceso es posible a través de la exculsión de solutos intracelulares osmóticamente activos, que reduce el gradiente osmótico transmembranal y por lo tanto el contenido de agua en el interior celular. En el presente trabajo se demuestra que en ratones de corteza cerebral de rata joven (3 días de edad) los aminoácidos libres son movilizados en respuesta a un incremento en el volumen celular producido por soluciones hiposmóticas. Al exponer las repajas de tejido a un medio con el 50% de la osmolaridad normal el contenido de agua se incrementa de 10.6 ± 0.98 a 14.9 ± 1.72 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de peso seco. En esta preparación la poza endógena de aminoácidos libres se encuentra constituida principalmente por (en moles/mg de proteína): taurina (454.5 ± 35.0), glicina (173.41 ± 5.7), alanina (47.5 ± 4.9), ácido glutámico (47.4 ± 4.9) y GABA (26.8 ± 1.5). En condiciones isotónicas el ácido glutámico, el GABA y la taurina son retenidos fuertemente en el interior celular, liberándose en un periodo de 15 min el 8.17 ± 2.08 , 11.6 ± 3.9 y $12.0 \pm 2.3\%$, respectivamente, del contenido inicial. En las mismas condiciones de alta osmolaridad de alanina (23.5 ± 2.5 y de $29.1 \pm 3.9\%$ del contenido inicial, respectivamente. En presencia de soluciones con 0.85 , 0.7 y 0.5 de la osmolaridad normal, la liberación basal del ácido glutámico se incrementó 42% , 167% y 430% y de la taurina 62% , 152% y 32% , respectivamente. De manera similar, la liberación basal de GABA se aumentó 40% , 97% y 134% , respectivamente. Utilizando H-taurina para seguir el curso temporal de la movilización se observó un incremento del 0.46% al 10 min en 2 min y luego una disminución gradual a pesar de persistir la hiposmolaridad. Estos resultados muestran que los aminoácidos libres son empleados con fines de control osmótico en la preparación estudiada y que la taurina es el aminoácido más importante debido a que constituye el 60% de la poza total de aminoácidos.

C213

ATLAS HISTOLOGICO DE LA RATA: CAMBIOS MORFOLOGICOS DEL INTESTINO DE LA RATA DURANTE EL DESARROLLO. Viquezas-Villaseca, R.M., (avalado por Diaz-Cintra, S.), Hegñandes-González, R., Rojas-Castañeda, J.C., Alvarez-García, C., Cravatte, J.. Unidad de investigación en Salud Infantil-IPN-SSA, Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Histología, Citología y Embriología, UNAM, México, D.F.

Debido a que la rata es frecuentemente utilizada en investigación, es necesario contar con un patrón de datos básicos que permitan al investigador decidir si es el mejor modelo animal para efectuar la investigación que se desea realizar, por no poderse hacer directamente en seres humanos. Con el propósito de identificar los principales cambios morfométricos que sufren las estructuras de la mucosa intestinal y determinar la edad en que se presentan dichos cambios, se realizó un estudio histológico con la técnica de hematoxilina-eosina para evaluar el tamaño y número de vellosidades y criptas intestinales, en 69 ratas macho cepa Wistar desde el nacimiento hasta el final del primer año de vida, distribuidas en 23 grupos de edades, con tres animales por edad. En las regiones estudiadas (duodeno no, yeyuno, ileon, colon y recto) los cambios morfológicos y cuantitativos pueden describirse en dos etapas expresadas en términos logarítmicos, la primera del nacimiento a los 28 - 42 días de edad caracterizada por un período de proliferación de vellosidades y criptas. La segunda etapa, se inicia a partir de los 28 - 42 días hasta los 360 días; se caracteriza por reducción en la velocidad de crecimiento. Estos resultados sugieren que la segunda etapa, posterior al destete (21 días), podría deberse al cambio de dieta de leche materna por alimento industrial, aunado tal vez, a cambios hormonales, así como a la presencia de antígenos en el alimento industrial como lo sugieren algunos autores. Estos interrogantes están siendo explorados en nuestro laboratorio.

C215

CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LAS FRACCIONES GRANULARES DE CELULAS CROMAFINES DE MEDULA SUPRARRENAL BOVINA. Feria-Velasco, A., Martínez de Muñoz, D., Gomora, J.C., Chávez, D. y Navarro, M.L.E. Div. Patología Exp., Unidad de Investigación Biomédica, I.N.S.S. Guadalajara, Jal. Depto. Fisiol., Biofisiol. y Neurociencias, CINVESTAV, I.P.N. y Depto. Fisiología, Instituto de Investigaciones Biológicas, U.N.A.M. México, D.F.

Las células cromafines de médula suprarrenal producen y almacenan catecolaminas y neuropéptidos en gránulos intracitoplasmáticos limitados por membrana. Estos contienen además diversas sustancias, algunas de las cuales tienen actividad enzimática. Al examinar un corte fino de células cromafines, con el microscopio electrónico de transmisión (MET), se identifican diversos tipos de gránulos en lo referente a su forma, tamaño y densidad al haz de los electrones. En el presente trabajo se hizo una separación de las diferentes poblaciones de gránulos citoplasmáticos de homogenado de médula suprarrenal bovina, mediante un gradiente discontinuo de Percoll (10,50,40 y 25%). Una alícuota de cada fracción se fijó en glutaraldehído amortiguado y se incluyó en resinas epoxy. Los cortes finos contrastados con plomo y uranio, se examinaron en un MET. La fracción 1 (arriba del Percoll 35%) estuvo principalmente constituida por microsomos, fragmentos de membrana y escasos gránulos densos pequeños. La fracción 2 estuvo formada por gránulos pequeños (0.2 µm) y medianos (0.3 µm). La mayor proporción de gránulos medianos se encontraron en las fracciones 3 y 4, los cuales disminuyeron en la fracción 5. La fracción 6 estuvo principalmente constituida por gránulos ovales o irregulares grandes (0.25 a 1.0 µm), que estructuralmente semejantes a lisosomas. Esto último se corroboró por identificación de actividad de fosfatasa Ácida con métodos bioquímicos en alícuota de esa fracción. En conclusión, después de varios experimentos, se tiene que con el método empleado las poblaciones de gránulos en las fracciones obtenidas, son constantes y permite hacer consideraciones más consistentes en los estudios bioquímicos que se están realizando en esas fracciones subcelulares en nuestros laboratorios (proteínas, catecolaminas, actividad de dopamina β-hidroxilasa y de acetilcolinesterasa).

C214

EFFECTOS HISTOLOGICOS DEL EXTRACTO DE GINKGO BILOBA EN ANIMALES CON LESION CORTICAL. Hernández-Pineda, R., Montiel, T. y Brailowsky, S. Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México, 04510 D.F.

Estudios previos han mostrado que el extracto de las hojas secas del árbol Ginkgo Biloba facilita la recuperación conductual de ratas con lobotomía frontal bilateral y ha mostrado tener efecto protector contra el daño cerebral causado por hipoxia.

Interesados en el tratamiento farmacológico de los sujetos con lesiones corticales, se estudió el efecto histológico del tratamiento crónico durante 30 días de extractos de Ginkgo biloba (EGb761-IPSEN) en ratas de la cepa Wistar con aspiración de la corteza motora.

A 12 animales con aspiración estereotáxica de la corteza motora de manera unilateral se les administró por vía oral 100 mg/kg del extracto disueltos en una solución de sacarina al 0.1% desde el primer día posterior a la cirugía.

A los animales control (n = 12) se les realizó una falsa cirugía y se les administró el vehículo sin el extracto durante el mismo lapso de tiempo.

Posteriormente, todos los sujetos fueron sacrificados, los cerebros cortados por congelación a 40 µm y procesados para tinción de Nissl e inmunocitoquímica contra la Proteína Fibrilar Ácida de la Glia (GFAP 1:250).

El análisis histológico mostró reactividad glial intensa en las zonas circundantes a la lesión y en los núcleos talámicos reticular anterior, ventromedial y ventral posterolateral ipsilateral a la lesión. Los animales tratados con el extracto presentaron una mayor simetría ventricular que los animales no tratados. Asimismo, la comparación de las cavidades ventriculares reveló áreas significativamente menores en las ratas que recibieron el EGB761 (12.87 ± 7.37 vs. 28.2 ± 8.03 mm³, t=3.15, p<0.01). En cuanto a la reacción gliótica, no se observaron diferencias entre los grupos.

Estos resultados sugieren un efecto anti-edematoso del EGB761. Vale la pena señalar que nuestro grupo ha mostrado efectos beneficios a nivel conductual de dicho tratamiento.

C216

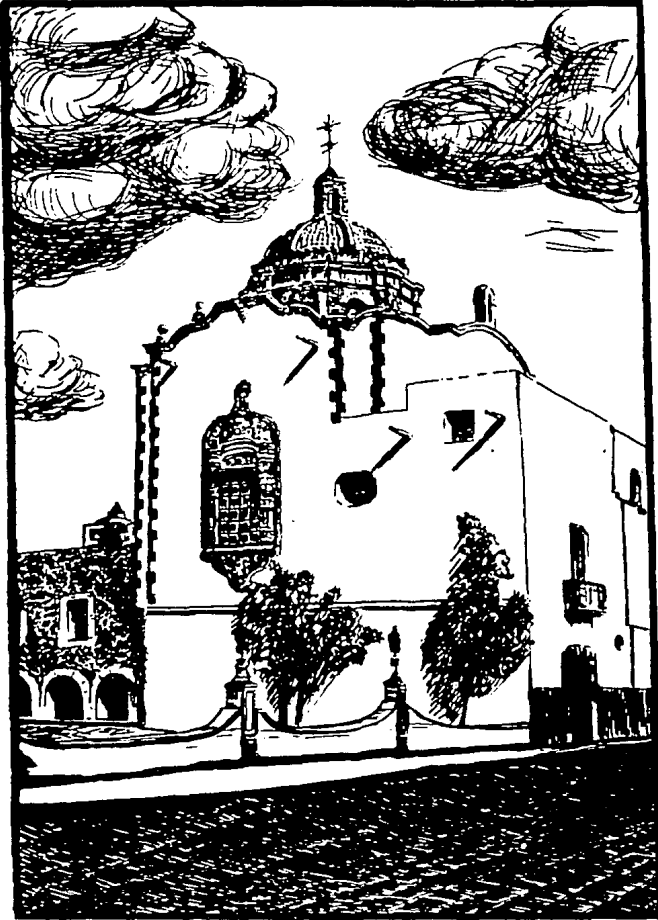
ALTERACIONES HISTOLOGICAS DE LA CORTEZA CEREBRAL DE RATONES CON DEFICIENCIA EN TAURINA. Casca-Rasfres, Y., Márquez-Orosco, M.C., Márquez-Orosco, A., Pasantes-Marín, R. y Norrín, J. Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, A.P. 70-555 México 04510 D.F. México.

La deficiencia de taurina produce una serie de alteraciones en el tejido nervioso, que incluyen la degeneración de la retina en gato, sono y roedores y un retraso en la diferenciación y migración de las células granulares del cerebelo en el gato (Sturman et al., J. Neurosci. Res., 13, 405, 1985). Los mecanismos subyacentes a este requerimiento de taurina no se conocen. Tampoco se ha descrito si en el caso de retraso en el desarrollo del cerebro, el daño se presenta únicamente en los gatos o es un fenómeno más general. Para responder a estas preguntas en el presente trabajo se investigaron los efectos de la deficiencia en taurina sobre la estructura histológica de las células nerviosas de la corteza cerebral del ratón. La deficiencia se consiguió a través del tratamiento con un inhibidor del transporte de taurina, el guanidino etanolaminato (GES), mediante el cual los niveles de taurina se reducen en más de 50%. Tres grupos de hembras de ratón de la cepa CD-1, de dos meses de edad ingirieron durante 4 a 12 semanas el primero una solución acuosa de GES al 1%, el segundo una solución de GES al 1% y taurina al 1% y el tercero agua estéril. A las 4, 6, 8 y 12 semanas de tratamiento, se sacrificaron, se obtuvieron los cerebros que fueron fijados en formalina al 10%. Los cortes se procesaron por la técnica habitual, se cortaron y tizaron con hematoxilina-eosina y azul de toluidina y se observaron al microscopio fotónico. En el cerebro de los animales tratados con GES se observó en algunos casos aumento en volumen del soma y el árbol dendrítico de las células de Purkinje y en otros estas células se observaban retraídas, pliocíticas o frías, asente en proceso de degeneración. En las áreas correspondientes a las terminales sinápticas y la glia que rodea al soma de las células de Purkinje se observaron espacios vacíos. Las alteraciones descritas empezaron a aparecer desde las cuatro semanas de tratamiento; en los animales que tomaron GES-taurina, dicho se detectó pero fue menos severo. Los resultados obtenidos indican que la deficiencia en taurina produce alteraciones celulares en los roedores, lo que sugiere que su requerimiento es un fenómeno más generalizado. Por otra parte, el tipo de alteraciones observadas indica que la participación de la taurina podría localizarse a nivel de los procesos que regulan el volumen celular. Esta evidencia se sum a la obtenida en preparaciones "in vitro" que parecen indicar que la taurina funciona como un osmoregular en el sistema nervioso.



6.2.9.7

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA, A. C.



Capilla de Aranzaga (S.L.P.)

Jose de Higuera 1990.

XVIII CONGRESO NACIONAL

11 a 16 de NOVIEMBRE de 1990

SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

EFFECTO DEL AMPc SOBRE LA BIOSINTESIS Y LIBERACION DE TRH EN CULTIVOS PRIMARIOS DE HIPOTALAMO DE CEREBRO DE RATA

MARCO GONZALEZ, J. Contreras, J.L. Rodriguez, J.L. Contreras y J. Contreras. Departamento de Bioquímica, CINSA, UNAM, A.P. 5103, Cuernavaca Mor. 62270, México.

Medios estudiado cuantitativa y cualitativa los factores involucrados en la biosíntesis y liberación de TRH y su ARNm, así como el TRH liberado en el medio.

Hipótesis: Inhibición de TRH y ARNm liberados extrínsecamente elevándose 85% de velocidad y un rendimiento de 3 X 10⁴ copias veces por hipotálamo, la duración del cultivo fue por lo menos de 30 días. Cultivos tratados con cafeína estrabado presentaron niveles disminuidos de ARNm y TRH entre los 18 y 23 días de incubación, la cantidad de TRH liberado en los cultivos fue alrededor de 150 pg por plato de cultivo.

La regulación de la biosíntesis de TRH se efectuó utilizando 8-bromo-AMPc, un análogo del AMPc. Los resultados obtenidos con esta factor intracelular mostraron un incremento en los niveles de ARNm y de TRH liberado en el medio, y una disminución en la cantidad de TRH intracelular. Fenotípico 20 µM comprobó los resultados antes indicados. Otros factores que pudieran afectar la regulación de la neurona TRH-érgica se probaron, siendo estos: KCl 50 mM como agente depolarizante y TPA 100 mM, inhibidor de la fosfodiesterasa C.

Estos resultados constituyen las primeras señales sobre un mecanismo celular y molecular vía AMPc que regulan los niveles de ARNm de TRH en forma acoplada a la liberación del péptido. Proyecto financiado en parte por CONACYT.

M-135

EFFECTO ESTROGENICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA 20- α HIDROXIPREGNENOLONA 17 β OXIDASA EN EL SISTEMA HIPOTALAMICO CENTRAL.
M.E. Salinas, M.E. Departamento de Biología, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F. 04510.

— Liberación de progesterona y estradiol) tratados con diferentes estructuras y etapas del desarrollo cerebral: amoniorrino hace pensar que la acción de hormonas esteroidales en tejido nervioso existe en etapas tempranas de la vida. Existen evidencias que en el área hipotalámica predilecta anterior y adenohipofisis la progesterona y algunos de sus metabolitos participan en actividades relacionadas con la conversión de esteroides. Los efectos producidos son: modificaciones en la actividad de la enzima de acetilcolinesterasa, en la conducta sexual, en la actividad de la acción química en las células blancas.

El propósito de la presente investigación es el estudio de la acción de hormonas esteroidales, en esta trabajo se estudia el efecto de estrógenos en la actividad de 20- α hidroxipregnenolona 17 β oxidasa (20HSD) en hipofisis anterior, hipofisis posterior, hipocampo y corteza cerebral de ratas hembras adultas. Los animales se ovariectomizaron y se les administró por vía subcutánea 5 o 10 µg de estradiol. El tejido cerebral se aisló homogenizó y se le adicionó un fracción soluble en la cual se realiza el ensayo radioactivo. La actividad enzimática se mide por la formación de 20 α -hidroxipregnenolona una reactiva a partir de (11 β -³H)-progesterona. Se comparó con los animales control.

M-137

HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA DESCARBOXILASA GLIUTAMICA DEL CEREBRO DEL RATON.

C. Pérez de la Mora, A.B. Roberto Silva y J. Mendieta Franco. Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología, UNAM, Apdo. Postal 70-600, México, D.F. 04500.

La descarboxilasa glutámica (GAD) juega un papel fundamental en el funcionamiento del sistema nervioso central de los mamíferos, pues el producto de su actividad, el ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor más difundido en este sistema.

Experimentos de diversas índoles mostraron en ratón y rata la presencia de dos formas de GAD que difieren en peso molecular así como en otras especies, formas moleculares que difieren en carga eléctrica e isotropibilidad.

Nuestros resultados muestran que en el ratón es posible mediante cromatografía de interacción iofórfica detectar dos formas que difieren en isotropibilidad. Asimismo, hemos podido aislar tres especies de GAD con diferente punto isoelectrónico. Por otro lado la evidencia GAD de alto peso molecular resultó de la agregación artefactual de la forma de bajo peso molecular, pues esta forma solo se produce bajo condiciones que favorecen la agregación proteica como es la precipitación con sales o solventes orgánicos y no aparece cuando los extractos de GAD se concentran por ultrafiltración en membranas de Amicon o simplemente sin concentrar cuando se procesan por cromatografía de interacción en Ultrasol Acil 3A.

PARTICIPACION DEL INTERCAMBIO CI⁺/Mg²⁺ EN LA REGULACION DEL pH INTRACELULAR (pH_i) EN BIOPRESTOS. María Mercedes Herrera, María Concepción Zambrano y Manuel Millán, Dept. de Fisiología, Univ. de San Luis Potosí, México y Dept. of Biochemistry, Health Science Center, Arizona University, U.S.A. En los neurones nerviosos de la rata no existen datos conclusivos sobre la presencia del intercambio CI⁺/Mg²⁺. Para la medición del pH_i citoplásmico, los sinaptosomas del cerebro de rata se cargan con pirrimina 5- α -N-CECF-AM. El pH_i se determina por el método de cocientes de fluorescencia, 663/605 por pirrimina 5- α -N-CECF. La remoción de Mg²⁺ promueve una rápida alcalinización del pH_i causada por una rápida activación (dependiente del Cl⁻) a un nivel basal más ácido. La adición de Mg²⁺ promueve exactamente los cambios opuestos. El medio libre de Cl⁻ induce una lenta alcalinización del citosol. La recuperación de una carga de Cl⁻ a 50 nMol/L con un promedio de 25 nMol/L de Cl⁻ se observa en un medio libre de Cl⁻ Mg²⁺. Sin embargo, el valor del pH_i en reposo es semejante en ambos con o sin Mg²⁺. En conclusión podemos decir que la regulación del pH_i en sinaptosomas depende de los actividades cambiantes de los intercambios CI⁺/Mg²⁺ y Cl⁻/K⁺. El primero opera siempre alcalinizando el citosol mientras que el Cl⁻/Mg²⁺ puede operar ya sea como un sistema acidificante o alcalinizante. Este trabajo fue parcialmente apoyado por los convenios SEP 229-01-0020, CONACYT P22900280270 a B-A y AIN 801 804300-01 a B y M-1.

M-136

ESTIMULOS NERVIOSOS INCREMENTAN RAPIDAMENTE EL NIVEL DE TRH EN EL HIPOTALAMO DE LA RATA. E.R. Urbán, J.L. Rodríguez, M.A. Vargas, S. González, y G. Carrabias, M. Martínez de la Cruz, F. Joseph-Braza, J.L. Contreras. Departamento de Biología, UNAM, Cuernavaca, Mor. Instituto de Investigaciones Biológicas UNAM, México, D. F.

La neurona TRHérgica hipotalámica regula el metabolismo en respuesta a estímulos hormonales, ambientales y neurales específicos.

Estamos interesados en estudiar el papel de estímulos nerviosos en la regulación del metabolismo de TRH. Como modelos experimentales empleamos ratas ovariectomizadas a estrógeno por frío y ratas lactantes estimuladas por succión. En los dos condiciones hemos encontrado aumentos en los niveles de ARNm de TRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo después de períodos cortos de estímulo o un estímulo rápido de los niveles de ARNm por abajo del grupo control. Mediciones de TRH en el hipotálamo metocho: muestran un patrón inverso a lo que ocurre con el ARNm pero con diferencias en la cinética de respuesta de los dos modelos: mientras que durante la succión, los niveles en el TRH correlacionan con el ARNm, en el estrógeno por frío la liberación y recuperación de la pose de TRH es mucho más rápida de lo que ocurre con el ARNm.

En resumen, los datos sugieren que estímulos que causan modificaciones rápidas de la biosíntesis de TRH activando, probablemente mecanismos que regulan los niveles de ARNm con el fin de recuperar la pose de TRH que fue liberado en respuesta a dichos estímulos. Apoyado por CONACYT.

M-138

QUANTIFICACION DEL CONTENIDO DE VARIAS FRACCIONES GRUPELARES DE LA GLIANDULA SUPRARRENAL.

Chavez, O., Gómez, J.C., Martínez de Muñoz, D., Navarro, M., Valverde, C. y Peris, V. Depto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, Deppto. Fisiología, I.I. S.-UNAM y Unidad de Investigaciones Biológicas de Occidente, D.F.S.

La principal función de las células cromafines es la síntesis de catecolaminas y noradrenalina que se almacenan en los gránulos cromafines.

El objetivo de este estudio es tratar de separar diferentes poblaciones de gránulos cromafines y caracterizarlos bioquímicamente y morfométricamente. Los gránulos cromafines se purificaron de un homogenizado de médula suprarrenal en un autogradiante de Percoll y en un gradiente discontinuo de Percoll (60,50,45 y 40%). En cada fracción se determinaron: proteínas totales, catecolaminas totales, dopamina β -hidroxilasa (DBH), acetilcolinesterasa (AChE), ATPasa y acetilcolinesterasa (AChE). Además, se cuantificaron por HPLC la noradrenalina y la adrenalina. Bioquímicamente se pueden distinguir dos tipos de gránulos, los más densos que están enriquecidos en DBH y noradrenalina y los menos densos que enriquecidos en AChE. En la fracción correspondiente a 35% se encuentran escasos mitocondrios, lo cual corresponde con la caracterización bioquímica. La diferenciación de tipos de gránulos cromafines serviría para determinar su desarrollo ontogénico y el tiempo de ellas se desdoblaba cuando la glándula se sometía a estímulos diferentes y sostenidos.