



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

Determinación del glutamato en la corteza prefrontal de la
rata en condiciones de estrés mediante electroforesis capilar

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Química Farmacéutica Bióloga

PRESENTA

Guadalupe Teresa Padilla Flores



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Profesora:	Ernestina Cervera Flores
VOCAL	Profesor:	Andrés Navarrete Castro
SECRETARIO	Profesora:	Leonila Irma Laura Escobar Pérez
1er. SUPLENTE	Profesora:	Gloria García Ramírez
2° SUPLENTE	Profesora:	María Eva González Trujado

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología. Edificio A de investigación, Laboratorio 510. UNAM.

Asesor del tema

Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez

Sustentante

Guadalupe Teresa Padilla Flores

AGRADECIMIENTOS

A Dios. Gracias por tu inmenso amor, por caminar a mi lado en todo momento y sostenerme cuando caigo. Gracias por guiarme con ternura, por mostrarme mis errores y escuchar mis súplicas. Gracias por darle sentido a mi vida y ayudarme a ser mejor cada día.

A mi madre, Concepción Padilla Flores. Gracias por darme la vida, por tu compañía y amor incondicionales. Gracias por tu comprensión e inmensa paciencia. Gracias por mostrarme lo maravillosa y poderosa que es la fe. Gracias por iluminar mi oscuridad con tu alegría y sabiduría, y por llenar mi vida con destellos de dulzura. Sin ti a mi lado, jamás lo hubiera logrado, tu has sido y serás mi motivo para seguir adelante. Te amo mamá.

A mis padrinos, Salvador Valencia Valencia, Teresa Necochea Suárez y Estela Roaro Alva. Gracias por sus consejos y enseñanzas, ustedes han contribuido de manera excepcional en mi crecimiento humano y espiritual. Gracias por su presencia y apoyo en los momentos importantes y difíciles de mi vida. Cada uno de ustedes ocupa un lugar muy especial en mi corazón.

A la familia Herroz Zamorano -Estelita, Azu y Paty-. Gracias por acogerme en su hogar y hacerme sentir segura y amada. Gracias por sus palabras de aliento, por su agradable compañía e inmensa comprensión. Siempre las recordaré con mucho cariño.

A la familia Pérez Chávez. Gracias por su apoyo incondicional. Especialmente al Dr. Jorge, gracias por sus valiosos consejos y el interés que mostró en mi recuperación; sin su atención oportuna no habría concluido mis estudios, mil gracias.

A Elvia Pérez Ramírez. Gracias por compartir tu tiempo conmigo, por estar a mi lado en las buenas y en las malas. Gracias por convertirme en una hermana para mí y enseñarme tantas cosas; cuando pienso en ti, no puedo evitar sonreír. Gracias amiga.

A mis compañeros de laboratorio: Liliana Pérez, Carolina Salvador, Beatriz Díaz, Claudia Rangel, Zinaelli López, Rolando Carrisoza y Carlos Chávez. Gracias por hacer del laboratorio un lugar divertido y agradable. Gracias por su compañía y comprensión, por sus consejos y apoyo incondicional. Realmente ha sido un placer trabajar al lado de personas tan maravillosas y talentosas como ustedes. Le agradezco especialmente a Antonio Romano y a

Liliana Pérez por su asesoría técnica en el manejo del equipo de electroforesis capilar, y a la Dra. Corinne Montes, por introducirme al mundo de la neurociencia y entrenarme en la disección del cerebro de la rata. A ustedes, gracias por su paciencia, así como por el tiempo y esfuerzo que invirtieron en mi preparación.

A la Dra. Laura Escobar Pérez, mi tutora. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Su entusiasmo por la investigación me inspiran día con día. Gracias por su apoyo, comprensión y paciencia. Gracias por alentar mi crecimiento académico y personal. Usted ha sido una luz en mi camino. Siempre le estaré agradecida.

Al Dr. Oscar Próspero García. Gracias por su colaboración en el desarrollo de este proyecto, por sus consejos y asesoría con respecto a la parte biológica de este trabajo. A la Dra. María Eva González, a la Dra. Ernestina Cervera y al Dr. Andrés Navarrete. Gracias por ayudarme a mejorar esta tesis con sus acertadas observaciones.

El financiamiento para la realización de este trabajo fue proporcionado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM bajo el programa de apoyo a la investigación: PAPIIT IN202110.

ÍNDICE	7
ABREVIATURAS	10
MARCO TEÓRICO	10
1. EL GLUTAMATO EN EL CEREBRO	10
1.1. Síntesis y metabolismo.....	11
1.2. Transportadores.....	12
1.3. Receptores.....	12
1.3.1. Receptores ionotrópicos.....	13
1.3.2. Receptores metabotrópicos.....	14
2. LA CORTEZA PREFRONTAL	16
3. EL SUEÑO	17
3.1. Sueño NMOR.....	18
3.2. Sueño MOR.....	18
3.3. Función del sueño MOR.....	18
3.3.1. Procesamiento de la información.....	19
3.3.2. Restauración.....	20
3.4. Regulación del sueño.....	20
3.5. Privación del sueño.....	21
3.5.1. Sueño de recuperación.....	21
4. ELECTROFORESIS CAPILAR	21
4.1. Antecedentes históricos.....	22
4.2. Generalidades e instrumentación.....	23
4.3. Fundamentos teóricos.....	23
4.3.1. Electroforesis.....	24
4.3.2. Electroósmosis.....	26
4.3.3. Movilidad aparente.....	26
4.3.4. Tiempo de migración.....	27
4.3.5. Eficiencia.....	27
4.4. Electroforesis Capilar de Zona.....	28
4.5. Electrolito de fondo.....	28
4.5.1. Ciclodextrinas.....	

4.6. Métodos de detección.....	29
4.6.1. Fluorescencia Inducida por Láser.....	30
5. OBJETIVOS.....	32
6. HIPÓTESIS.....	32
7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	33
7.1. Reactivos.....	33
7.2. Animales.....	33
7.3. Protocolo de privación de sueño.....	33
7.4. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas.....	33
7.5. Preparación de soluciones.....	34
7.6. Reacción de derivatización.....	34
7.7. Equipo de electroforesis capilar y condiciones de separación.....	34
7.8. Análisis de los datos.....	35
8. RESULTADOS.....	36
8.1. Optimización de la concentración de ácido bórico.....	36
8.2. Optimización de la concentración de β -ciclodextrina.....	36
8.3. Eficiencia de la separación.....	37
8.4. Linealidad del método.....	38
8.5. Precisión del método.....	39
8.6. Límites de detección y cuantificación.....	41
8.7. Cuantificación de aminoácidos en muestras de corteza prefrontal de rata.....	42
9. DISCUSIÓN.....	45
9.1. Optimización de la separación electroforética.....	45
9.2. Efecto del estrés y la privación del sueño MOR sobre los niveles de glutamato en la corteza prefrontal de la rata.....	46
10. CONCLUSIONES.....	51
11. REFERENCIAS.....	52

ABREVIATURAS

α -CG	α -Cetogluturato
AMPA	α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
Asp	Aspartato
CC	Control de caja
CE	Control de estrés
CORT	Corticosterona
CPF(m, dl, vm)	Corteza prefrontal (medial, dorsolateral, ventromedial)
EAAT(s)	Excitatory amino acid transporter(s)
EEG	Electroencefalograma
EPSP	Excitatory post-synaptic potential
GABA	γ -Aminobutyric acid
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GLAST	Glutamate and aspartate transporter
Gli	Glicina
GLT-1	Glutamate transporter 1
Glu	Glutamato
GluTs	Glutamate transporters
Gln	Glutamina
GPCRs	G protein-coupled receptors
GRs	Glucocorticoid receptors
GS	Glutamina sintetasa
HC	Hipocampo
iGluRs	Ionotropic glutamate receptors
mGluRs	Metabotropic glutamate receptors
MOR	Movimientos oculares rápidos
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMOR	Sin movimientos oculares rápidos
PAG	Phosphate-activated glutaminase
PS	Privación de sueño
PSM	Privación de sueño MOR
PC	Piruvato carboxilasa
REC	Recuperación
SNC	Sistema nervioso central

SOL	Sueño de onda lenta
VGLUTs	Vesicular glutamate transporters

Abreviaturas de Electroforesis

AcBo	Ácido bórico
β -CD	β -ciclodextrina
BGE	Background electrolyte
CBQCA	3-(4-carboxibenzoil)-2-quinolincaboxaldehído
CEC	Capillary electrochromatography
CD(s)	Ciclodextrina(s)
CIEF	Capillary isoelectric focusing
CITP	Capillary isotacophoresis
CZE	Capillary zone electrophoresis
<i>D</i>	Coeficiente de difusión
<i>d.i.</i>	Diámetro interno
DMSO	Dimetilsulfóxido
ϵ	Constante dieléctrica
<i>E</i>	Magnitud del campo eléctrico
EC	Electroforesis capilar
<i>F</i>	Coeficiente de fricción
F_E	Fuerza del campo eléctrico
F_f	Fuerza de fricción
FEO	Flujo electroosmótico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FQ	5-Furoilquinolin-3-carboxaldehído
HPCE	High performance capillary electrophoresis
<i>I</i>	Intensidad de la corriente eléctrica
<i>L</i>	Longitud total del capilar (columna)
L_D	Longitud del capilar del punto de inyección al detector (longitud efectiva)
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LIF	Laser-induced fluorescence
MEKC	Micellar electrokinetic chromatography

μ_{ap}	Movilidad aparente
μ_{eo}	Movilidad electroosmótica
μ_{ep}	Movilidad electroforética
N	Número de platos teóricos
NBD-F	4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol
NDA	Naftaleno-2,3-dicarboxaldehído
OPA	o-ftalaldehído
q	Carga iónica
R	Resistencia
r	Radio iónico
SDS	Sodium dodecilsulfate
T	Temperatura
t_m	Tiempo de migración
UV	Ultravioleta
V	Voltaje
v_{ap}	Velocidad aparente
v_{eo}	Velocidad electroosmótica
v_{ep}	Velocidad electroforética
η	Viscosidad
ζ	Potencial zeta

Unidades

cm	centímetros	mM	milimolar
g	gramos	mm	milímetros
h	horas	nL	nanolitros
Hz	hertz	°C	grados Celsius
kV	kilovolts	rpm	revoluciones por minuto
M	molar (mol/L)	s	segundos
mg	miligramos		
mL	mililitros		
μ M	micromolar		

MARCO TEÓRICO

1. EL GLUTAMATO EN EL CEREBRO

El glutamato (Glu) es un aminoácido no esencial, incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que en el sistema nervioso central (SNC) se sintetiza a partir de precursores locales. El Glu participa en diversos procesos dentro del cerebro, entre ellos, la síntesis proteica, el metabolismo energético y la detoxificación de amonio, así como la síntesis de ácido γ -aminobutírico (GABA) y de glutatión. Además, es el neurotransmisor excitador más importante del cerebro (Erecinska & Silver, 1990). Entre el 80 y 90 % de las sinapsis de la corteza cerebral son glutamatérgicas (Bovento *et al.*, 2002). Sin embargo, la acumulación de Glu en el espacio extracelular es neurotóxica, como se observa en la isquemia cerebral y varias enfermedades neurodegenerativas (Camacho & Massieu, 2006; Sheldon & Robinson, 2007).

1.1. Síntesis y metabolismo

El Glu se metaboliza a través del ciclo Glutamato-Glutamina (*Fig. 1*), en neuronas y células de la glia. Tras la despolarización de las neuronas glutamatérgicas, el Glu se exocita a la hendidura sináptica. Los transportadores de Glu (GluTs), presentes en los astrocitos circundantes, capturan el Glu del espacio extracelular. La glutamina sintetasa (GS), enzima exclusiva de la glia, produce glutamina (Gln) a partir del Glu. La Gln pasa de la glia al espacio extracelular y de éste, al interior de las terminales nerviosas; estos procesos son mediados por el sistema transportador N1 (SN1) de la glia y los sistemas transportadores A1 y A2 (SA1/2) de las neuronas, respectivamente. La glutaminasa activada por fosfato (PAG), enzima mitocondrial neuronal, utiliza la Gln para generar Glu. Los transportadores vesiculares de Glu (VGLUTs) lo introducen al interior de las vesículas sinápticas para su almacenamiento. El ciclo comienza de nuevo con la liberación del Glu al espacio sináptico (Danbolt, 2001; Foster & Kemp, 2006).

El ciclo Glu-Gln no es estequiométrico, pues cierta cantidad del Glu que entra a los astrocitos se degrada oxidativamente para producir energía. En consecuencia, el mantenimiento de la poza neuronal requiere la síntesis *de novo* de Glu. Este proceso ocurre principalmente en la glia, ya que las neuronas al carecer de la enzima piruvato carboxilasa (PC), no pueden llevar a cabo la síntesis neta de Glu a partir de glucosa. La carboxilación del piruvato genera

oxaloacetato (OA), el cual entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). El OA se condensa con la acetil coenzima A para generar citrato. Este último, se metaboliza en el ciclo TCA para formar α -cetoglutarato (α -CG), el precursor directo del Glu. El α -CG se encuentra en equilibrio dinámico con el Glu, tanto en astrocitos como en neuronas, a través de una transaminación bidireccional mediada por la deshidrogenasa del Glu (GDH) (Hertz & Zielke, 2004; McKenna, 2007).

El funcionamiento adecuado de las neuronas glutamatérgicas recae en el sustento energético y metabólico que proveen los astrocitos. Por lo tanto, la homeostasis del Glu depende del trabajo conjunto de los componentes neuronales y gliales relacionados con la síntesis, metabolismo y transporte del Glu (Pellerin & Magistretti, 2004).

1.2. Transportadores de Glutamato

La concentración de Glu en el espacio extracelular debe mantenerse baja para evitar el daño neuronal debido a la sobreestimulación de los receptores de Glu (excitotoxicidad). La recaptura celular constituye el mecanismo más eficiente para retirar el Glu del espacio extracelular y es mediada por los transportadores de Glu (GluTs). Se conocen cinco transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs) de alta afinidad dependientes de Na^+ , los cuales se encuentran en las membranas plasmáticas de las células de la glia (EAA1-2) y de las neuronas (EAAT3-5). Como su nombre lo refiere, los EAATs transportan Glu y aspartato (Asp), así como análogos del Glu (Danbolt, 2001). El transporte del Glu por los EAATs está acoplado al cotransporte de tres Na^+ y un H^+ , y al contratransporte de un K^+ (Zerangue & Kavanaugh, 1996).

En roedores, EAAT1 y EAAT2 corresponden a GLAST (transportador de Glu y Asp) y GLT-1 (transportador 1 de glutamato), respectivamente. EAAT3 es el transportador principal de las neuronas del cerebro y la médula espinal, mientras que EAAT4 lo es del cerebelo y EAAT5 de la retina. De los transportadores gliales, GLT-1 se encuentra en los astrocitos de todo el SNC, con una presencia notable en el hipocampo (HC) y la corteza; es responsable por cerca del 90% de la actividad de transporte del Glu en el cerebro anterior. Por su parte, GLAST predomina en la glia de Bergmann del cerebelo (Danbolt, 2001). Mediante el *knockout* individual de los GluTs, GLT-1 y GLAST se identificaron como los transportadores de mayor relevancia en la recaptura del Glu (Rothstein *et al.*, 1996).

Además de prevenir la acumulación del Glu, los GluTs regulan los niveles de Glu a los que están expuestos los receptores postsinápticos, modulando así la neurotransmisión glutamatérgica. Asimismo, hay que resaltar que los GluTs forman parte del ciclo Glu-Gln, por lo tanto, son indispensables para reabastecer las pozas neuronales del transmisor Glu (Danbolt, 2001; Daikhin & Yudkoff, 2000).

La disfunción de los GluTs se ha relacionado con diversas condiciones neurodegenerativas, entre las que se encuentran: las enfermedades de Huntington, Alzheimer y Parkinson, la epilepsia y la esclerosis lateral amiotrófica, (Beart & O'Shea, 2007; Sheldon & Robinson, 2007).

1.3. Receptores de Glutamato

Los receptores de Glu se clasifican en ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos (iGluRs) se subdividen en tres grupos con base en la especificidad de un agonista sintético: receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA), kainato y N-metil-D-aspartato (NMDA). Los iGluRs permiten la entrada de Na^+ a la célula postsináptica, lo que provoca la despolarización de la membrana. Los receptores metabotrópicos (mGluRs) están acoplados a proteínas G, las cuales regulan la producción intracelular de segundos mensajeros.

1.3.1. Receptores ionotrópicos

Los receptores AMPA y kainato forman canales permeables a Na^+ ; su activación corresponde al pico temprano del potencial excitatorio postsináptico (EPSP). Los receptores NMDA también son permeables al Na^+ , pero presentan una mayor permeabilidad al Ca^{2+} , y su activación se asocia con el componente tardío del EPSP (Walton & Dodd, 2007).

El receptor AMPA es un complejo tetramérico compuesto por las subunidades GluR1-4, que puede ser hetero- u homomérico. La subunidad GluR2 es de interés particular, pues su presencia en el complejo determina una permeabilidad extremadamente baja al calcio. Es decir, los receptores AMPA carentes de la subunidad GluR2 permiten una entrada significativa de Ca^{2+} , y podrían estar involucrados en los mecanismos de excitotoxicidad (Hara & Snyder, 2007). Los receptores kainato muestran dos tipos de subunidades: GluR5-7 y KA1-2. Los receptores funcionales pueden ser heteroméricos, compuestos por las

subunidades KA1 y 2 en combinación con subunidades GluR5-7, o bien, homoméricos, compuestos únicamente por subunidades GluR5-7. Las propiedades y localización de los receptores kainato no están bien definidas, debido a su afinidad parcial por los antagonistas de los receptores AMPA.

Los receptores NMDA presentan una estructura tetramérica que consiste en una subunidad NR1, donde se encuentra el sitio de unión a glicina (Gli), en combinación con subunidades NR2A-D, que contienen el sitio de unión a Glu, y en algunos casos con subunidades NR3A-B. El canal iónico que forma el receptor NMDA se encuentra bloqueado por Mg^{2+} al potencial de reposo de la membrana; este bloqueo se libera conforme la membrana se despolariza. La activación del receptor NMDA depende de la unión simultánea del Glu y la Gli (coagonista) a sus sitios respectivos, además de la despolarización de la membrana postsináptica (mediada por la activación previa de los receptores AMPA y kainato). Estudios recientes en roedores, sugieren que la D-serina también actúa como coagonista endógeno del receptor NMDA en el sitio de Gli (Foster & Kemp, 2006).

1.3.2. Receptores metabotrópicos

Los **mGluRs** pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Se conocen ocho mGluRs y se agrupan en tres familias con base en su estructura, farmacología y señal de transducción. El grupo I (mGluR1 y 5) se acopla a G_q e induce la ruptura del inositol trifosfato, mientras que los grupos II (mGluR2 y 3) y III (mGluR4, 6-8) se acoplan a $G_{i/o}$ e inhiben la adenilato ciclasa. Además, miembros de los tres grupos pueden interactuar directamente con canales de calcio o potasio regulados por voltaje a través de sus proteínas G. El grupo I predomina postsinápticamente, y se piensa que favorece la neurotransmisión a través del incremento de la conductancia de calcio y la reducción de la hiperpolarización posterior, además de intensificar los eventos mediados por el receptor NMDA. Los grupos II y III predominan presinápticamente, pero también pueden encontrarse en la membrana postsináptica y la glia (Foster & Kemp, 2006).

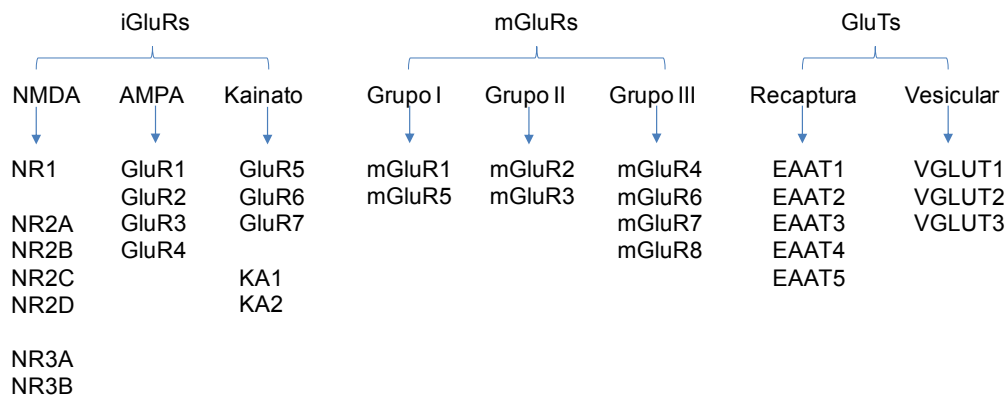
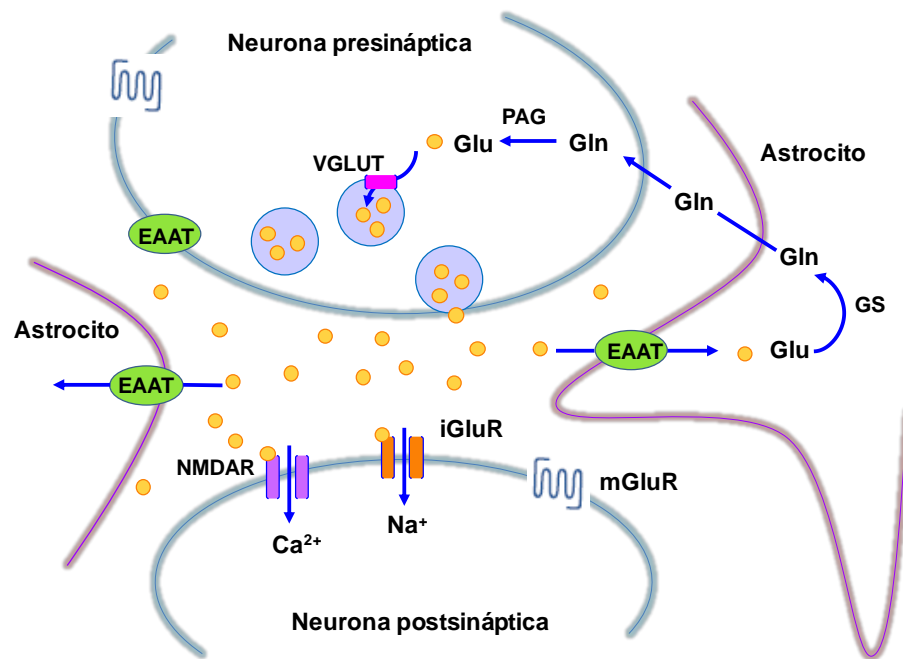


Fig. 1. Componentes moleculares del sistema de neurotransmisión glutamatergico.

2. LA CORTEZA PREFRONTAL

La corteza prefrontal (CPF) es una región de la neocorteza (sectores no motores del lóbulo frontal) que presenta conexiones recíprocas con el tálamo mediodorsal, la mayoría de los sistemas sensoriales y motores, así como con varias estructuras subcorticales. La ubicación anatómica y conectividad de la CPF le permite coordinar un amplio rango de procesos cognitivos (Miller & Cohen, 2001). La CPF se relaciona con la memoria de trabajo, los procesos complejos de atención y las funciones ejecutivas (planeación, toma de decisiones, flexibilidad conductual, razonamiento lógico, monitoreo del comportamiento).

La memoria de trabajo es la capacidad de mantener temporalmente una representación mental de cierta información, no disponible a los sentidos, que se desea manipular con un propósito particular. La memoria de trabajo permite integrar y organizar dicha información para planear una acción; es la base de la toma de decisiones y la resolución de problemas (Dash *et al.*, 2007).

Se ha sugerido que la CPF dorsolateral (CPFdl) de los humanos está asociada con la actividad cognitiva, mientras que la CPF ventromedial (CPFvm) con la regulación emocional. Las funciones de estas dos regiones parecen estar integradas en la CPF medial (CPFm) de la rata, la cual se divide en las cortezas cingulada anterior (AC), prelímbica (PL) e infralímbica (IL) (Holmes & Wellman, 2009).

La CPF es extremadamente sensible a la falta de sueño. Las funciones cognitivas relacionadas con CPF se deterioran tras una vigilia prolongada (Muzur *et al.*, 2002). En humanos, la privación de sueño por 24 h provoca una disminución significativa de la tasa metabólica cerebral de la glucosa, especialmente marcada en la CPF, la cual se correlaciona con una disminución del desempeño cognitivo y la atención (Thomas *et al.*, 2000). Se ha reportado que durante el sueño hay una regulación a la baja de numerosos genes en la CPF de la rata (Romcy-Pereira *et al.*, 2009) y que durante el sueño de onda lenta (SOL), la mayor parte del cerebro presenta una actividad reducida, incluyendo la CPF. Específicamente, se ha observado que la CPFdl mantiene una “desactivación” relativa incluso durante el sueño MOR, a diferencia de estructuras como la amígdala y el HC (Braun *et al.*, 1997; Maquet *et al.*, 1996;). Estos hechos sustentan la idea de que la CPF necesita un descanso más pronunciado que el resto del cerebro para recuperarse de la intensa actividad que muestra durante la vigilia.

Asimismo, existe evidencia de la susceptibilidad de la CPF al estrés (McEwen, 2007). En ratas, el estrés crónico deteriora la memoria de trabajo espacial y la flexibilidad conductual, ambas dependientes de la CPF (Cerqueira *et al.*, 2007). Las deficiencias cognitivas que provoca el estrés se han correlacionado con la retracción de las dendritas apicales de las neuronas piramidales (glutamatérgicas) de las capas superficiales de la CPF (Radley *et al.*, 2004). También se ha propuesto que la CPF participa en la regulación de la respuesta al estrés (Cerqueira *et al.*, 2008). En este sentido, la neurotransmisión mediada por el Glu tiene un papel fundamental, ya que todas las eferencias de la CPF y la mayoría de sus aferencias

–en particular las que provienen del tálamo, HC y amígdala- son glutamatérgicas (Moghaddam, 2002).

Es importante mencionar que la disfunción de la CPF se ha vinculado con varios padecimientos psiquiátricos como el desorden de estrés post-traumático, la depresión y la esquizofrenia (Arnsten, 2009a).

3. EL SUEÑO

El sueño es un estado reversible de inconsciencia, inmovilidad relativa y una capacidad limitada de respuesta ante los estímulos medioambientales. El sueño afecta diversos procesos en el organismo, incluyendo el metabolismo energético cerebral (Scharf *et al.*, 2008), el aprendizaje y la memoria (Walker & Stickgold, 2004), el funcionamiento del sistema inmune (Imeri & Opp, 2009) y la expresión génica (Cirelli & Tononi, 2000).

El sueño es heterogéneo y dinámico; en los mamíferos terrestres y las aves, se divide en sueño con movimientos oculares rápidos (MOR) y sueño sin movimientos oculares rápidos (NMOR), los cuales se alternan en un ciclo que dura 90 minutos aproximadamente y que se repite de 5 a 6 veces cada noche. En humanos, el sueño NMOR representa alrededor del 80% y se subdivide en cuatro etapas (E1-E4), mientras que el sueño MOR ocupa el 20% restante (Fig. 2). El tiempo que pasamos en alguno de estos tipos de sueño cambia conforme amanece, de una predominancia del sueño NMOR durante el primer ciclo, a una predominancia del sueño MOR en el ciclo final (Zisapel, 2007).

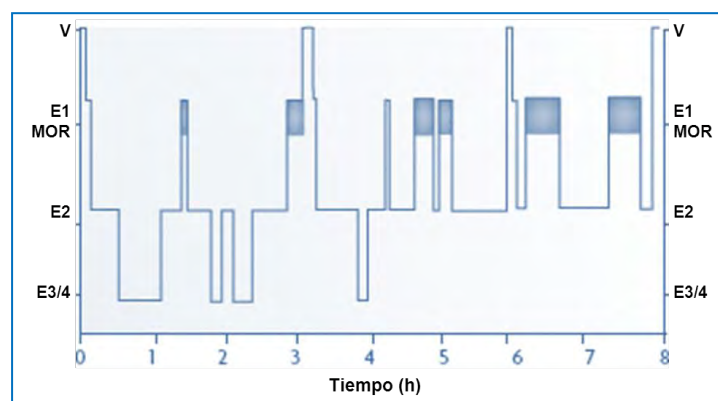


Fig. 2. Hipnograma del sueño en humanos (modificada de Cirelli, 2009; V: vigilia; E1-E4: etapas del sueño NMOR).

El ciclo del sueño de la rata solo dura de 10 a 12 minutos. La rata duerme del 50 al 65 % de su tiempo y lo hace principalmente durante el período de luz. El sueño de la rata no se consolida en una sola fase, es interrumpido por períodos de actividad (sueño polifásico) (Datta & MacLean, 2007).

3.1. Sueño NMOR

El sueño NMOR se caracteriza por la disminución de la actividad corporal: tono muscular, movimiento, ritmo cardiaco, presión sanguínea, metabolismo y temperatura. En humanos, el sueño NMOR se subdivide en cuatro etapas, cada una de las cuales se puede reconocer por sus características electroencefalográficas (*Fig. 3*). La etapa 1 corresponde a la transición de la vigilia al sueño. Las ondas alfa (8-13 Hz) que acompañan a la vigilia desaparecen y en su lugar aparecen las ondas theta (4-7 Hz); sólo dura algunos minutos y es recurrente.

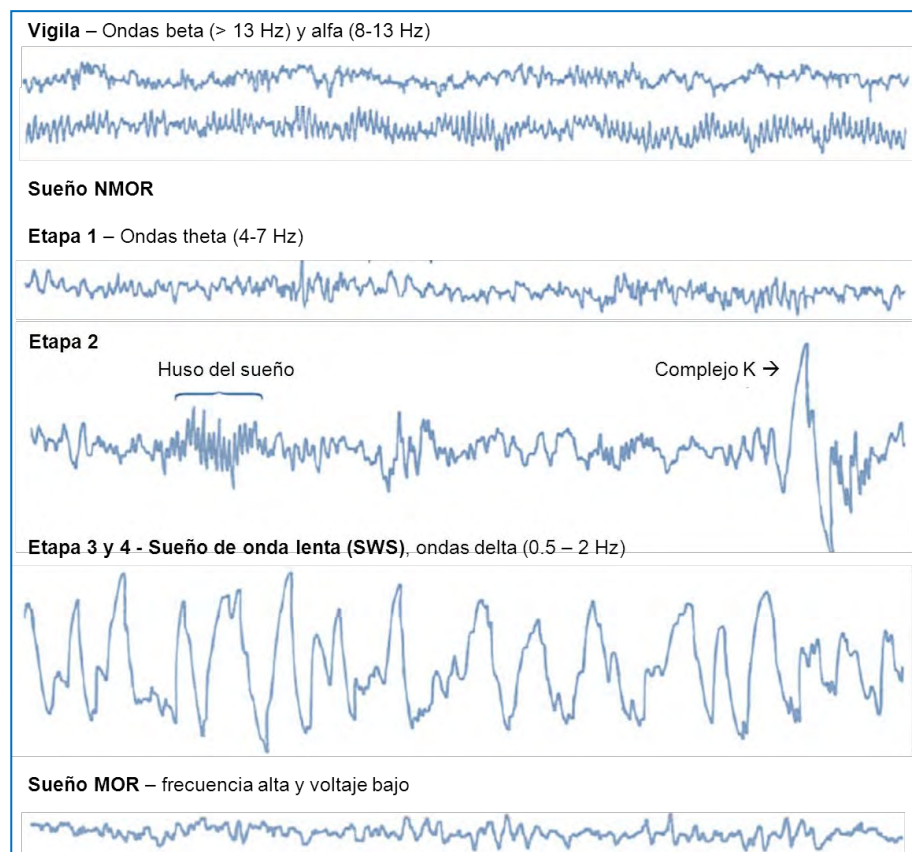


Fig. 3. Características electroencefalográficas de las etapas del sueño (modificada de Swick, 2005).

La etapa 2 se caracteriza por la disminución de la frecuencia y el aumento de la amplitud de

las ondas del electroencefalograma (EEG). Se observan grupos de picos de alta frecuencia de manera intermitente llamados husos del sueño, los cuales son estallidos periódicos de actividad de 10 a 12 Hz que duran de 1 a 2 segundos. También se observan los llamados complejos K, de distribución aleatoria, que al parecer corresponden a estímulos auditivos. Las etapas 3 y 4 se conocen en conjunto como sueño de onda lenta (SOL). Es el nivel de sueño más profundo; la frecuencia de la actividad electroencefalográfica es muy baja (0.5 a 2 Hz) y su amplitud alta, patrón que corresponde a las ondas delta y que refleja una actividad eléctrica sincronizada de las neuronas corticales. Estas etapas son seguidas por un regreso a la etapa 2 y el inicio del primer episodio de sueño MOR (Kolb & Whishaw, 2009).

3.2. Sueño MOR

El sueño MOR fue reconocido por primera vez en 1953 por Kleitman y Aserinsky. Posteriormente, Jouvet lo denominó sueño paradójico, debido a que su patrón electroencefalográfico es muy parecido al de la vigilia. Durante el sueño MOR ocurren dos tipos de cambios: tónicos y fásicos. Los primeros se mantienen a lo largo del sueño MOR, mientras que los segundos ocurren episódicamente. Algunas características tónicas son: la pérdida del tono muscular (excepto en los músculos del diafragma y en aquéllos involucrados con el movimiento ocular), la actividad desincronizada de frecuencia alta y voltaje bajo en el EEG (*Fig. 4*) y la supresión de la termorregulación. Entre las características fásicas se encuentran: los movimientos oculares rápidos, la contracción repentina de músculos en el oído medio y los dedos de manos y pies (esto rompe brevemente con la atonía), así como períodos de irregularidad en el ritmo cardíaco y respiratorio (Datta & MacLean, 2007).

3.3. Función del sueño

La función del sueño es incierta ya que la comprensión de los procesos celulares y moleculares subyacentes es incompleta. A continuación, se exponen brevemente dos de las hipótesis más aceptadas al respecto.

3.3.1. Procesamiento de la información

Establece que el sueño MOR tiene una participación fundamental en el aprendizaje y la consolidación de la memoria. Las evidencias principales que soportan esta hipótesis son: a)

el aumento del sueño MOR en roedores tras su entrenamiento en una tarea específica, así como el deterioro del aprendizaje si hay una privación del sueño MOR post-entrenamiento (Hennevin *et al.*, 1995); b) la regulación a la alta de *zif-268* (gen inmediato temprano asociado con la plasticidad) durante el sueño MOR cuando la rata se expone previamente a un ambiente estimulante (Ribeiro *et al.*, 1999); c) la reaparición de los patrones de actividad neuronal que se observan mientras el individuo ejecuta una tarea durante el episodio subsecuente de sueño MOR (Maquet, 2000); d) la regulación a la alta de los genes relacionados con la síntesis proteica en la corteza cerebral de la rata durante el sueño (Cirelli, 2005).

En contra de esta hipótesis se ha planteado que: a) no se puede determinar si los procesos del aprendizaje son afectados por el estrés inherente al protocolo experimental o por la pérdida de sueño *per se*, b) no se han reportado deficiencias notables en la memoria, atribuibles al uso prolongado de antidepresivos tricíclicos e inhibidores de la monoamina oxidasa (MAO), los cuales reducen los parámetros del sueño MOR (revisado en Siegel, 2001).

3.3.2. Restauración

Establece que el sueño es necesario para revertir el daño que ocurre durante la vigilia, incluyendo el estrés oxidativo, la depleción de los almacenes de energía y la desensibilización de los receptores. La privación de sueño de largo plazo (semanas) en ratas provoca la desregulación metabólica, que eventualmente conduce a la muerte (Rechtschaffen *et al.*, 1989). Asimismo, existe una correlación entre el tamaño corporal (y cerebral) y la cantidad de sueño requerida. Los animales pequeños (que presentan una tasa metabólica mayor que los animales grandes) duermen más, probablemente para enfrentar el estrés oxidativo generado durante la vigilia y para reparar (o reemplazar) los componentes celulares del SNC. Particularmente, durante el sueño MOR se desconectan la mayoría de los sistemas monoaminérgicos, lo que podría favorecer su recuperación (Siegel, 2003).

Sin embargo, este modelo es insuficiente para explicar por qué el sueño no es similar a la hibernación. Además, mientras que el sueño NMOR se asocia con una disminución del gasto energético, durante el sueño MOR se registra un aumento del flujo sanguíneo y el metabolismo de la glucosa en la mayor parte del cerebro (Maquet, 1995; Nofzinger *et al.*, 1997).

3.4. Regulación del sueño

Existen dos mecanismos de regulación del sueño: circadiano y homeostático. El mecanismo circadiano determina el horario de consolidación del sueño en un período de 24 h (día en roedores y noche en humanos). En los mamíferos, se ha mostrado que el núcleo supraquiasmático del hipotálamo es el responsable de los ritmos circadianos. El mecanismo homeostático establece el nivel de propensión al sueño con base en la duración de la vigilia previa; la presión de sueño se acumula mientras estamos despiertos y se reduce mientras dormimos. La prolongación de la vigilia por encima de su duración fisiológica provoca una mayor intensidad y/o duración del sueño que la sucede (Cirelli, 2009).

La necesidad de sueño también se regula localmente pues las regiones del cerebro que se someten a una potenciación sináptica (por ejemplo, durante el aprendizaje) muestran mayor cantidad de SOL (Huber *et al.*, 2004). La cantidad y calidad de sueño se evalúa a través del EEG, cuyo análisis permite determinar la duración del sueño (h por día), los porcentajes del sueño MOR y NMOR, así como el porcentaje de cada etapa del sueño NMOR. Mediante el EEG también se pueden conocer la latencia del sueño NMOR y MOR, el número de veces que el sujeto despierta después del inicio del sueño y la actividad de onda lenta durante el sueño NMOR (Cirelli, 2009).

3.5. Privación del sueño

La privación del sueño (PS) ha sido la estrategia de elección para estudiar las funciones del sueño debido a que promueve alteraciones conductuales, fisiológicas y moleculares (Banks & Dinges, 2007; McEwen, 2006; Cirelli *et al.*, 2006).

En ratas, la PS de largo plazo afecta el metabolismo energético, la termoregulación y la función inmune. Conforme pasan los días, los animales se vuelven hiperfágicos y al mismo tiempo pierden peso, su temperatura corporal desciende, se debilitan y desarrollan úlceras en cola y patas, finalmente mueren tras 2 o 3 semanas de PS total (Rechtschaffen *et al.*, 1989).

La PS en humanos produce irritabilidad, fatiga, dificultad para concentrarse, disminución de la productividad y la tendencia a cometer errores en tareas que implican atención y diferentes habilidades cognitivas. Los efectos negativos de la PS sobre las funciones cognitivas han

sido reconocidos ampliamente tanto en humanos (Alhola & Polo-Kantola, 2007; Yoo *et al.*, 2007) como en ratas (Alvarenga *et al.*, 2008), sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a este deterioro no son claros.

3.5.1. Sueño de recuperación

La PS provoca el aumento de la duración y/o profundidad del sueño de recuperación, lo que se conoce como “rebote” del sueño. Se ha propuesto que el cerebro lleva un registro del sueño perdido, el cual debe ser compensado. Sin embargo, los porcentajes de recuperación no son iguales para todas las etapas del sueño, ya que se favorecen el SOL y el sueño MOR, lo que sugiere su importancia en alguna función restauradora.

Es probable que el rebote del sueño MOR aparezca por la necesidad de inactivar ciertos grupos celulares que permanecen activos durante la vigilia pero que se “apagan” durante el sueño MOR, tales como los sistemas histaminérgicos, noradrenérgicos y serotoninérgicos. Este fenómeno podría beneficiar varios procesos celulares, por ejemplo, las rutas metabólicas requeridas para la síntesis de monoaminas y sus receptores, los mecanismos involucrados en su recaptura y metabolismo, así como la resensibilización de los receptores ante la ausencia de sus agonistas (Siegel, 2003).

4. ELECTROFORESIS CAPILAR

4.1. Antecedentes históricos

En 1937, Tiselius mostró que la electroforesis tenía una aplicación potencial como técnica analítica de separación al utilizarla para separar las proteínas del suero; por su trabajo obtuvo el premio Nobel en 1948. El enfoque experimental que propuso Tiselius presentaba varias limitaciones, debidas básicamente a la convección térmica. Es así que en años posteriores, los esfuerzos se enfocaron en mejorar la técnica mediante el uso de distintos materiales anticonvectivos (papel, acetato de celulosa, almidón, agarosa y poliacrilamida). En 1967, Hjertén y colaboradores describieron la electroforesis en capilares de diámetros pequeños (mm) hechos de cuarzo. En la década de los 70's, Virtanen y Mikkers reportaron el uso de capilares de 200 μm de diámetro interno (*d.i.*) hechos de vidrio y teflón, respectivamente. En 1981, Jorgerson y Lukacs introdujeron un instrumento de diseño simple, el cual permitía llevar cabo la electroforesis en capilares de vidrio fundido de 75 μm de *d.i.*

con un formato de detección “en columna”. La investigación subsecuente condujo al refinamiento de la tecnología del instrumento hasta alcanzar el estado actual de automatización (Landers, 1996; Lauer & Rozing, 2009).

4.2. Generalidades e instrumentación

La electroforesis capilar (EC) agrupa una familia de técnicas analíticas que utilizan un capilar ($< 200 \mu\text{m}$ de *d.i.*) como medio de soporte para separar una gran variedad de moléculas (iones inorgánicos, aminoácidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, entre otras). Los componentes básicos del equipo de EC son: un capilar de sílice fundida (SiO_2) recubierto con poliimida, una fuente de alto voltaje (5-30 kV), dos electrodos de platino, dos viales (de entrada y de salida) para el electrolito de fondo, un vial para la muestra, un sistema de enfriamiento y un detector (Fig. 4). El recubrimiento de poliimida le confiere flexibilidad al capilar. Para crear la ventana de detección “en columna”, dicho recubrimiento se retira fácilmente mediante la aplicación de calor. Bajo una polaridad normal, el ánodo se localiza en el extremo de introducción de la muestra y el cátodo se ubica cerca del detector en el extremo opuesto. Los electrodos se encuentran conectados a una fuente de alto voltaje y junto con los extremos del capilar, se sumergen en el electrolito de fondo, presente en los viales de entrada y salida. La introducción de la muestra se realiza mediante la aplicación de voltaje (inyección electrocinética) o de presión (inyección hidrodinámica) luego del reemplazo temporal del vial de entrada por el vial de la muestra (Harvey, 2000; Landers, 1996).

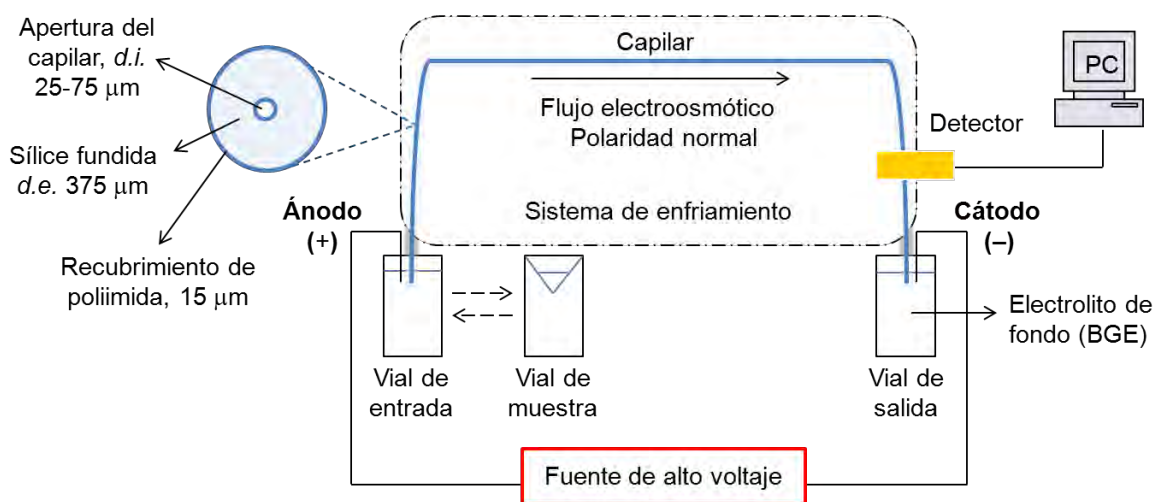


Fig. 4. Componentes básicos del equipo de Electroforesis Capilar.

La EC ofrece una serie de ventajas inherentes a su diseño instrumental, como el requerimiento de volúmenes muy pequeños de muestra (nL), eficiencias de separación altas y tiempos de análisis cortos. Además, utiliza medios acuosos y ofrece una gran variedad de modos de separación (Lauer & Rozing, 2009).

Cuadro 1. Criterios de separación y aplicaciones de los diferentes modos de EC

Modo de EC	Criterio de separación	Analitos
Electroforesis capilar de zona (CZE)	Movilidad electroforética (relación carga/masa)	Compuestos orgánicos ionizables; iones inorgánicos
Cromatografía micelar electrocinética (MEKC)	Distribución entre las fases acuosa y micelar cargada	Compuestos orgánicos ionizables y neutros
Electrocromatografía capilar (CEC)	Partición entre las fases estacionaria y móvil	Compuestos orgánicos ionizables y neutros
Electroforesis capilar en gel (CGE)	Tamaño y carga	Proteínas, péptidos, DNA, RNA, oligonucleótidos
Enfoque isoelectrico capilar (CIEF)	Punto isoelectrico	Proteínas, péptidos
Isotacoforesis (CITP)	Límites de movilidad	Iones pequeños

Adaptado de Lauer & Rozing, 2009.

4.3. Fundamentos teóricos

4.3.1. Electroforesis

La electroforesis es el movimiento de moléculas cargadas (iones) presentes en un medio líquido por la influencia de un campo eléctrico. Si dos solutos tienen diferentes movilidades electroforéticas, entonces su separación es posible (Weinberger, 2000). El movimiento iónico está gobernado por dos fuerzas: una impulsora (eléctrica) y una de retardo (fricción). La primera depende de la magnitud del campo eléctrico (E) y de la carga iónica (q):

$$F_E = qE \quad (1)$$

La segunda es proporcional a la velocidad electroforética del ión (v_{ep}) y al coeficiente de fricción (f):

$$F_f = fv_{ep} \quad (2)$$

Casi instantáneamente, los iones alcanzan una velocidad constante que corresponde al equilibrio entre estas dos fuerzas:

$$qE = fv_{ep} \quad (3)$$

El coeficiente de fricción (f) está relacionado con el radio iónico (r) y la viscosidad del medio (η), según la ecuación de Stokes:

$$f = 6\pi\eta r \quad (4)$$

La velocidad electroforética (v_{ep}) de los iones también se puede expresar como el producto de la movilidad electroforética (μ_{ep}) y el campo eléctrico:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (5)$$

La combinación de las ecuaciones 3, 4 y 5, permite expresar la movilidad electroforética como sigue:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (6)$$

De la ecuación 6 se deduce que a mayor carga y/o menor radio iónico (tamaño), mayor es la movilidad electroforética del ión (Chankvetadze, 1997).

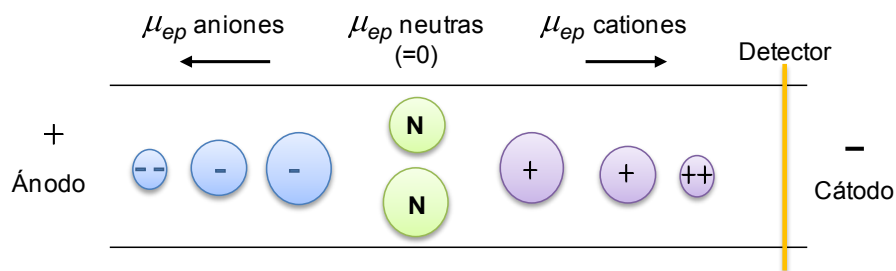


Fig. 5. Movilidad electroforética de aniones, cationes y especies neutras.

4.3.2. Electroósmosis

La electroósmosis se refiere al movimiento del electrolito de fondo (BGE) a través del capilar bajo la influencia de un campo eléctrico. La superficie interna del capilar de sílice fundida está cubierta por grupos silanol (SiOH), los cuales se desprotonan a un pH mayor a 3. Los iones positivos del electrolito son atraídos hacia la superficie negativa del capilar (grupos silanoato, SiO^-), lo que da lugar a la formación de la doble capa eléctrica (Fig. 6). Al aplicar un campo eléctrico a través del capilar, los cationes de la región difusa de la doble capa migran hacia el electrodo negativo. Las moléculas de agua que solvatan a los iones migrantes son arrastradas en el proceso (Harris, 2005). El flujo electroosmótico (FEO) se transmite a lo ancho del capilar, aunque el espesor aproximado de la doble capa sea de tan sólo 100 Å, al parecer, debido a los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua y las interacciones tipo van der Waals entre los componentes del electrolito (Weinberger, 2000).

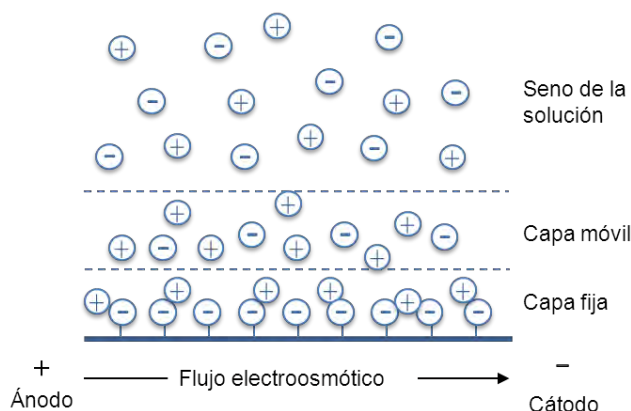


Fig. 6. Representación del flujo electroosmótico y la doble capa eléctrica.

Las ecuaciones que describen al FEO son similares a las del fenómeno electroforético. La velocidad del flujo electroosmótico (v_{eo}) se define como:

$$v_{eo} = \mu_{eo} E \quad (7)$$

Donde μ_{eo} es la movilidad electroosmótica, una constante de proporcionalidad entre la velocidad del FEO y la magnitud del campo eléctrico. La movilidad electroosmótica es directamente proporcional a la constante dieléctrica del medio (ϵ) y al potencial zeta (ζ), e inversamente proporcional a la viscosidad del medio (η):

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi \eta} \quad (8)$$

La carga en la superficie de las paredes del capilar y el grosor de la doble capa determinan el potencial zeta. Por lo tanto, el FEO se reduce con la disminución del pH y/o el incremento de la fuerza iónica. En el primer caso, debido a la protonación de los grupos silanoato y la correspondiente disminución de la carga superficial. En el segundo caso, debido a la compactación de la doble capa ante una mayor concentración de cationes (Chankvetadze, 1997; Lauer & Rozing, 2009).

El FEO presenta un perfil de flujo plano, ya que el movimiento del fluido es uniforme en prácticamente todo el diámetro del capilar, a diferencia del flujo hidrodinámico, que al ser inducido por una diferencia de presión (bomba), muestra un perfil de flujo parabólico, en el que la solución se mueve más rápido en el centro de la columna y más lento cerca de las paredes (Fig. 7). En este sentido, el FEO es preferible al flujo hidrodinámico, ya que no contribuye a la dispersión de las zonas de los analitos (Skoog *et al.*, 1998).



Fig. 7. Comparación del perfil de flujo electroosmótico e hidrodinámico.

4.3.3. Movilidad aparente

La movilidad aparente (μ_{ap}) de un analito es la suma de la movilidad electroforética del analito y la movilidad electroosmótica del electrolito:

$$\mu_{ap} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad (9)$$

La velocidad aparente (v_{ap}) del analito es directamente proporcional a la movilidad aparente y a la magnitud del campo eléctrico aplicado:

$$v_{ap} = \mu_{ap} E \quad (10)$$

Los analitos neutros carecen de movilidad electroforética, migran con la misma dirección y velocidad del FEO y por ende, no se separan. Los aniones y cationes difieren en el componente electroforético de su movilidad aparente, lo que determina su separación. La movilidad aparente de los cationes es mayor que la de los aniones porque se mueven en la misma dirección del FEO, al contrario de los aniones. A un pH moderado (>3), la velocidad electroosmótica es mayor que la electroforética, lo cual permite que los aniones migren hacia el cátodo, donde se localiza el detector. A un pH muy bajo, la electroósmosis es débil y los aniones nunca alcanzarían el detector, a menos que la polaridad del equipo se invierta para cambiar la localización del detector del extremo catódico al extremo anódico del capilar (Weinberger, 2000).

4.3.4. Tiempo de migración

El tiempo de migración (t_m) es el tiempo que tarda un soluto en moverse desde el comienzo del capilar hasta la ventana de detección. Se calcula considerando la distancia entre el punto de introducción de la muestra y la ventana de detección (L_D), así como la velocidad aparente:

$$t_m = \frac{L_D}{v_{ap}} \quad (11)$$

El tiempo de migración también se puede expresar en términos del voltaje aplicado (V) y la longitud del capilar (L), si se sustituye la velocidad aparente ($v_{ap} = \mu_{ap}E$) y se considera la expresión del campo eléctrico ($E = V/L$):

$$t_m = \frac{L_D L}{\mu_{ap} V} \quad (12)$$

Esta ecuación nos permite asumir que la disminución del tiempo de migración se logra mediante la utilización de voltajes altos y/o capilares cortos. Asimismo, se deduce que un incremento del FEO, también disminuye el tiempo de análisis (Lauer & Rozing, 2009).

4.3.5. Eficiencia

La eficiencia de la EC depende del número de platos teóricos (N), que puede determinarse mediante la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\mu_{ep} + \mu_{eo} \vec{V}}{2D} \quad (13)$$

Donde D es el coeficiente de difusión del soluto. En esta ecuación se puede notar que el uso de voltajes altos y el incremento del FEO, favorecen la eficiencia de la separación. Además, se puede prever que los solutos que tienen movilidades electroforéticas altas, y que en consecuencia experimentan en menor grado la difusión, tienen un mayor número de platos teóricos (Harvey, 2000).

4.4. Electroforesis Capilar de Zona (CZE)

La CZE es el modo de EC más utilizado debido a su simplicidad y versatilidad. Al introducir la muestra, ésta se distribuye en una zona estrecha (banda) que es rodeada por el electrolito de fondo. Al aplicar el campo eléctrico, los componentes de la muestra migran de acuerdo a su movilidad aparente para formar zonas individuales. La separación de aniones y cationes es posible, sin embargo, las moléculas neutras no se separan pues migran a la misma velocidad del FEO (Skoog *et al.*, 1998).

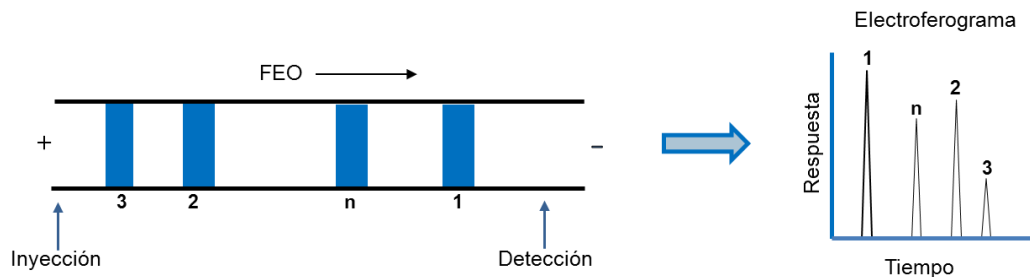


Fig. 8. Esquema de la CZE. 1: analito catiónico, n: analito(s) neutro(s), 2 y 3: analitos aniónicos.

4.5. Electrolito de fondo

El electrolito de fondo (BGE) es una solución iónica acuosa, cuyas funciones principales son: generar la corriente eléctrica requerida para la separación y mantener un pH constante. El paso de la corriente eléctrica a través del BGE provoca dos fenómenos importantes en el proceso electroforético: el FEO (ya explicado anteriormente) y el calor de Joule. Este último, se genera por las colisiones entre los iones migrantes y las moléculas del electrolito durante el proceso de separación. El calor de Joule induce el desarrollo de gradientes térmicos a través del capilar. Sin embargo, el uso de capilares de diámetro pequeño permite la disipación eficiente del calor, lo que a su vez habilita el uso de voltajes altos. La aplicación de voltajes elevados mejora las eficiencias de separación y disminuye los tiempos de migración (Beckers & Bocek, 2003; Chankvetadze, 1997).

La selectividad, el orden relativo de migración de los solutos, está determinada por el mecanismo de separación. La manipulación de la selectividad permite mejorar la resolución. En la CZE, la selectividad se puede alterar por un cambio de pH o por la adición de otras sustancias (aditivos) al BGE. Los aditivos pueden cumplir diversas funciones, por ejemplo: modificar la movilidad de los analitos (equilibrio secundario), aumentar su solubilidad o afectar el FEO (Weinberger, 2000).

4.5.1. Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos macrocíclicos que resultan de la digestión enzimática del almidón. Se componen por moléculas de D-(+)-glucopiranosas unidas entre sí mediante enlaces α -1,4-glicosídicos. Su forma es la de un cono truncado con dos aperturas de diámetros diferentes. La apertura pequeña consiste en grupos hidroxilo primarios en la

posición C-6 de las unidades de glucosa, mientras que la apertura mayor contiene hidroxilos secundarios en las posiciones C-2 y C-3. Los grupos hidroxilo en la posición C-2 apuntan hacia el interior de la cavidad mientras que los hidroxilos en C-3 se orientan hacia afuera (Fig. 10). La presencia de un gran número de grupos hidroxilo en la superficie de las CDs determina su solubilidad acuosa. La cavidad interna de las CDs es relativamente no polar, por lo cual tienen la habilidad de formar complejos de inclusión con una gran variedad de moléculas hidrofóbicas. El proceso no involucra la formación de enlaces químicos ni cambios estructurales en la molécula huésped. La selectividad de la interacción depende del tamaño, forma y propiedades fisicoquímicas tanto del soluto como de la CD utilizada. Las CDs más comunes son la α , β y γ , que contienen 6, 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente. Las CDs son estables e inertes en un rango amplio de pH y tienen absorptividad baja al ultravioleta (UV) (Chankvetadze, 1997).

Entre las áreas de aplicación de las CDs se encuentran: la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética, ambiental y textil, y por supuesto, la química analítica. En la EC se emplean principalmente en las separaciones enantioméricas (Singh *et al.*, 2002).

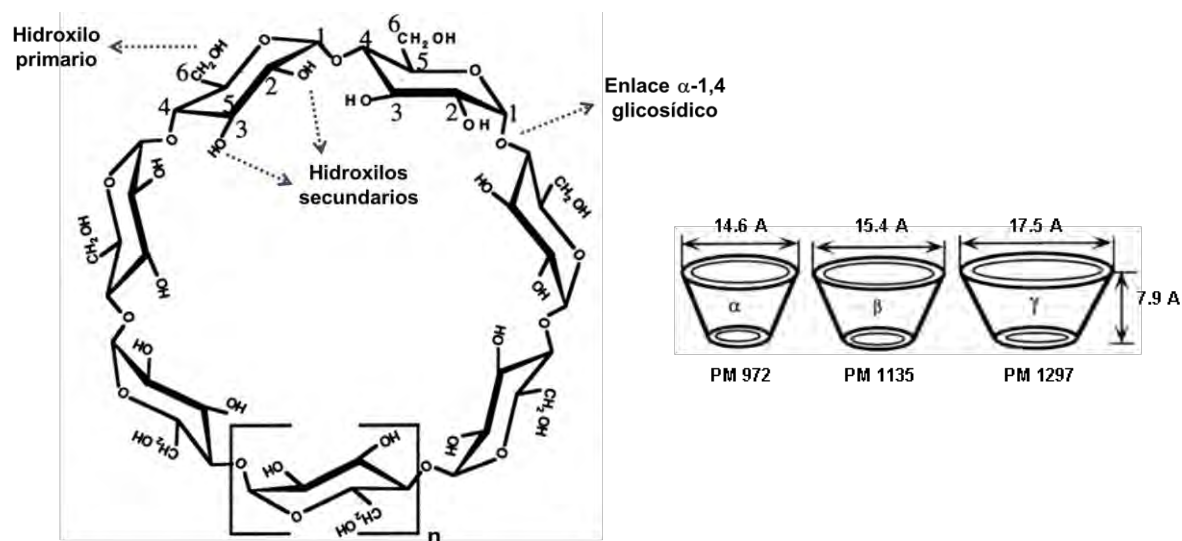


Fig. 9. Estructura, forma y dimensiones de las ciclodextrinas; β -CD, $n=1$ (modificada de Luong & Nguyen, 1997).

4.6. Métodos de detección

El método de detección más utilizado en la EC es la absorción al UV debido a su costo accesible. Sin embargo, existen otros métodos que ofrecen límites de detección (LODs)

menores, como la fluorescencia, la espectrometría de masas, la fluorescencia inducida por láser (LIF) y la detección electroquímica.

<i>Cuadro 2. Métodos de detección disponibles para EC y sus LODs</i>	
Método de detección	Límites de detección (M)
Absorbancia UV/Vis	10^{-5} - 10^{-7}
Absorbancia indirecta	10^{-4} - 10^{-6}
Fluorescencia	10^{-7} - 10^{-9}
Fluorescencia inducida por láser	10^{-13} - 10^{-16}
Espectrometría de masas	10^{-8} - 10^{-10}
Amperometría	10^{-7} - 10^{-10}
Conductividad	10^{-7} - 10^{-9}
Radiometría	10^{-10} - 10^{-12}

Modificado de Harvey, 2000.

4.6.1. Fluorescencia inducida por láser (LIF)

El uso de un láser como fuente de excitación para generar fluorescencia es una excelente opción, ya que tiene una gran capacidad de enfoque (compatible con las dimensiones de un capilar) y su contribución al ruido de fondo es mínima debido a su naturaleza monocromática. Existe una gran variedad de láseres que se pueden usar en la detección LIF, entre los más comunes están los de ion argón, helio-cadmio y helio-neón. La luz láser se transmite al capilar a través de un cable de fibra óptica. La fluorescencia se colecta mediante un espejo elipsoidal y se enfoca de regreso hacia el tubo fotomultiplicador (Weinberger, 2000).

Pocas moléculas poseen fluorescencia nativa, por lo general se requiere su derivatización, una modificación química de los analitos que los hace detectables. Las reacciones de derivatización se clasifican en pre-, en- o post-columna de acuerdo a si se realizan antes, durante o después de la separación electroforética. Los reactivos que se utilizan para la derivatización pueden ser fluoróforos o fluorogénicos; los primeros son fluorescentes *per se*, mientras que los segundos generan productos fluorescentes al reaccionar con el analito (Bardelmeijer *et al.*, 1998).

Se han utilizado diversos compuestos para la derivatización de aminoácidos, algunos de

ellos son: isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Li *et al.*, 2001; Pobozy *et al.*, 2006), naftaleno-2,3-dicarboxaldehído (NDA) (Bert *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006), 3-(4-carboxibenzoil)-2-quinolincarboxaldehído (FQ) (Chen *et al.*, 2001) y 3-(4-carboxibenzoil)-2-quinolincaboxaldehído (CBQCA) (Boulat *et al.*, 2001; Thongkhao-On *et al.*, 2004; Patterson II *et al.*, 2008).

El CBQCA es un agente fluorogénico que reacciona con aminas primarias (Fig. 10) (Liu *et al.*, 1991). Algunas de las ventajas del uso del CBQCA son: produce derivados estables, no contribuye al ruido fluorescente de fondo, permite alcanzar límites de detección bajos, presenta una excelente linealidad de detección y es compatible con la línea del láser del ión argón de 488 nm (Arriaga *et al.*, 1995).

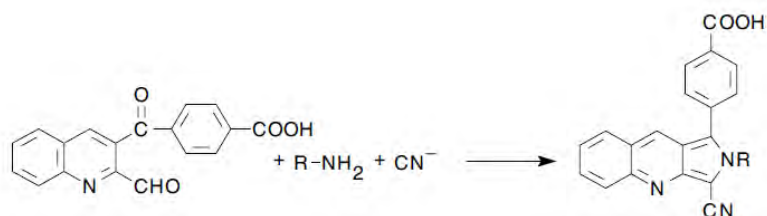


Fig. 10. Reacción de derivatización de aminas con CBQCA.

5. OBJETIVO

Separar y cuantificar por EC el Glu presente en muestras de CPF de ratas sometidas a estrés y privación de sueño MOR.

OBJETIVOS PARTICULARES

Establecer la composición del electrolito de fondo y las condiciones óptimas de separación del Glu y otros aminoácidos (GABA, Gli y Asp) mediante EC.

Evaluar el efecto de la adición de β -CD al electrolito de fondo.

Determinar la linealidad y precisión del método, así como los límites de detección y cuantificación.

6. HIPÓTESIS

⇒ Los niveles de Glu en la CPF de la rata se verán afectados debido a las condiciones de estrés y privación de sueño MOR.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1. Reactivos

El 3-(4-carboxibenzoil)quinolin-2-carboxaldehído (CBQCA) se adquirió en Molecular Probes. El dimetilsulfóxido (DMSO), cianuro de potasio (KCN), ácido bórico (AcBo), β -ciclodextrina (β -CD), ácido L-aspártico (Asp), ácido L-glutámico (Glu), ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina (Gli) y L-norleucina (Nleu) se obtuvieron en Sigma-Aldrich. El hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl) y cloroformo se adquirieron en J.T. Baker.

7.2. Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar de 250 a 300 g de peso para formar los grupos experimentales siguientes: control de caja (CC), control del estrés (CE), privación de sueño MOR (PSM) y recuperación (REC). Las ratas se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad 12:12 h, con agua y alimento *ad libitum*.

7.3. Protocolo de privación de sueño*

La privación selectiva del sueño MOR se realizó durante 72 h mediante la técnica de la plataforma única. El grupo CC se colocó en cajas de acrílico con una cama de aserrín. Las ratas del grupo PSM se colocaron en cajas provistas de una plataforma central pequeña (7.5 cm de diámetro) rodeada de agua. Durante el sueño MOR las ratas pierden el tono muscular, y al entrar en contacto con el agua, despiertan. Las ratas del grupo CE se sometieron a las mismas condiciones que el grupo PSM excepto que se usaron plataformas de un diámetro mayor (17.5 cm), lo que les permitió dormir pero simulando el entorno de estrés asociado al modelo de privación de sueño. Las ratas del grupo REC fueron tratadas exactamente igual que las ratas del grupo PSM, pero al término de la privación de sueño, se les permitió dormir durante 24 h para favorecer su recuperación.

7.4. Obtención* y procesamiento de las muestras biológicas

Las ratas se sacrificaron por dislocación y se decapitaron con una guillotina. Inmediatamente, se disectó la corteza prefrontal y se pesó. Por cada 100 mg de tejido, se adicionó 1 mL de solución amortiguadora de boratos 50 mM pH 9 para homogenizar. Posteriormente, se indujo la precipitación de las proteínas en los homogenados mediante la adición de cloroformo y centrifugación a 14000 rpm durante 20 min a 4 °C. Los sobrenadantes se recuperaron y se

filtraron a través de membranas de 0.2 μm (Millipore). Las muestras se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

* En colaboración con la Dra. Corinne Montes Rodríguez y realizado en el laboratorio del Dr. Oscar Prospero García (Grupo de Neurociencias del Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina).

7.5. Preparación de soluciones

Se prepararon soluciones stock 0.01 M con estándares de los aminoácidos (L-Glu, L-Asp, GABA, Gli y L-Nleu) en agua desionizada y se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la curva de calibración se realizaron las diluciones correspondientes a partir de las soluciones stock, obteniéndose concentraciones finales de 1 a 20 μM .

Las soluciones amortiguadoras se prepararon con AcBo (50, 100, 150 y 200 mM) y NaOH 1 M para ajustar el pH a 10. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada y se filtraron a través de membranas de 0.2 μm antes de usarse.

7.6. Reacción de derivatización

La solución de CBQCA 10 mM se preparó en DMSO y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El KCN se disolvió en agua desionizada para generar una solución stock 0.2 M, a partir de la cual se preparó una dilución 10 mM.

La reacción de derivatización se llevó a cabo en viales ámbar por la adición sucesiva de: 12.5 μL de solución amortiguadora de boratos 50 mM pH 9.0, 1.5 μL de muestra (dilución 1:5), 1 μL de Nleu (estándar interno) 0.25 mM, 4.5 μL de CBQCA 10 mM y 3 μL KCN 10 mM. La reacción se mantuvo a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 h.

7.7. Equipo de Electroforesis Capilar y condiciones de separación

- Equipo de Electroforesis Capilar (HPCE, Beckman Coulter P/ACE 5010) acoplado a un láser de argón con una longitud de excitación de 488 nm (Beckman P/ACE System Laser Module 488) y a un detector LIF (Beckman P/ACE LIF detector).
- Columna (capilar de sílice fundida): 57 cm de longitud total (50 cm de longitud efectiva), 75 μm de diámetro interno y 375 μm de diámetro externo.

- Temperatura de 25 °C, inyección hidrodinámica durante 6 s y voltaje de 18 kV.
- Electrolito de fondo: AcBo 200 mM, β -CD 10 mM, pH 10.
- Secuencia de lavados para estabilizar la columna: HCl 0.1 M por 5 min, agua desionizada por 3 min, NaOH 0.1 M por 5 min, agua desionizada por 3 min y BGE por 10 min.
- Secuencia de lavados entre corridas: agua desionizada por 2 min y BGE por 3 min.
- Alícuota de la muestra derivatizada: 5 mL. Volumen de inyección aproximado: 23 nL.
- Tiempo de análisis aproximado: 30 min.

7.8. Análisis de los datos

El equipo de EC está acoplado a una computadora que cuenta con el programa *System Gold* de Beckman, el cual genera la información necesaria para analizar los electroferogramas (gráficas de la respuesta en función del tiempo) tales como: tiempos de migración, altura y área de los picos, magnitud de la corriente, entre otros. Los aminoácidos de interés se identificaron por su tiempo de migración particular, mientras que el área de los picos se utilizó como parámetro de cuantificación ya que presenta una relación lineal con respecto a la concentración de los analitos. A partir de la curva de calibración de cada aminoácido, se calculó su concentración en la muestra introducida al sistema electroforético. Para obtener la concentración en términos de $\mu\text{mol/g}$ tejido se consideraron los factores de dilución correspondientes y el peso del tejido.

Finalmente, se graficó el promedio y error estándar de las concentraciones de cada aminoácido por grupo experimental. El análisis estadístico se realizó con el programa *SigmaPlot*. Los datos se sometieron a un ANOVA (análisis de varianza de una vía), seguido de una prueba Holm-Sidak para efectuar la comparación múltiple por pares de grupos, considerándose un nivel de significancia de 0.05.

8. RESULTADOS

8.1. Optimización de la concentración de ácido bórico

A mayor concentración de ácido bórico (AcBo) en el electrolito de fondo (BGE), menor es la velocidad del flujo electroosmótico (FEO), debido al aumento de la fuerza iónica. Esta tendencia se confirmó al probar tres concentraciones distintas de AcBo: 50, 100 y 150 mM. El pH se ajustó a 10 con NaOH 1M. Cuando el BGE contenía 50 o 100 mM, los picos del ácido γ -aminobutírico (GABA) y norleucina (Nleu, estándar interno) se traslaparon, así que en las pruebas posteriores se utilizó AcBo 150 mM.

8.2. Optimización de la concentración de β -ciclodextrina

Para evaluar el efecto de la β -ciclodextrina (β -CD) sobre la intensidad de la fluorescencia y el tiempo de migración de los aminoácidos, se prepararon soluciones amortiguadoras de boratos con diferentes concentraciones de β -CD (2.5, 5, 7.5 y 10 mM) y con base en la información obtenida se estableció su concentración óptima en el BGE.

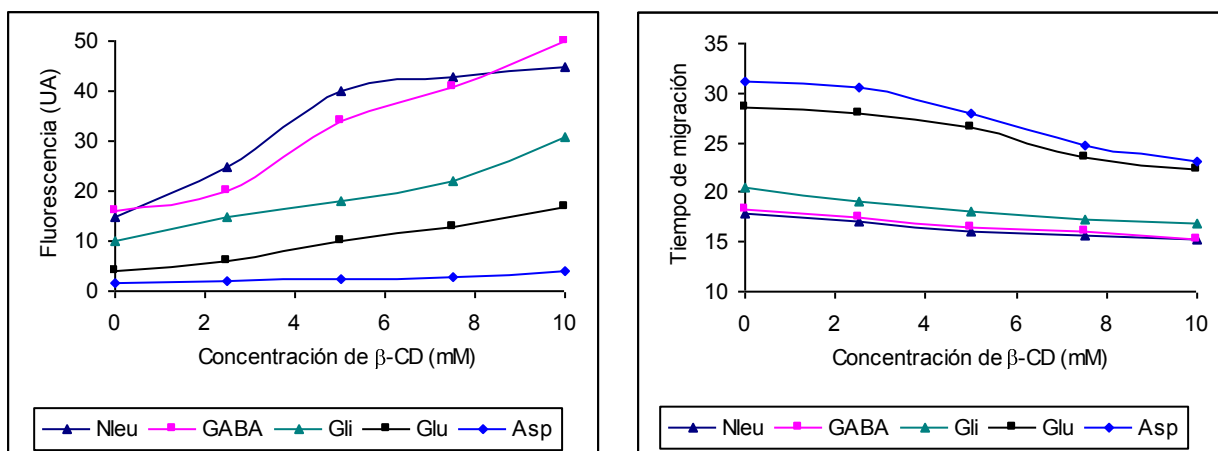


Fig. 11. Efecto de la concentración de β -CD sobre la intensidad de la fluorescencia y el tiempo de migración de los aminoácidos de estudio.

Se observó que la concentración de β -CD en el BGE se correlaciona positivamente con la fluorescencia de los derivados y negativamente con el tiempo de migración (Fig. 11). Entre mayor sea la señal fluorescente emitida por los derivados, más sensible es el método; por lo tanto, se eligió la concentración más alta de β -CD. Sin embargo, a una concentración de 10 mM de β -CD, los derivados de GABA y Nleu no se resolvieron por completo, por lo que se

aumentó la concentración de AcBo de 150 a 200 mM para lograr su resolución adecuada. La composición final del BGE fue: AcBo 200 mM, β -CD 10 mM, pH 10. El voltaje y la temperatura de separación se fijaron en 18 kV y 25 °C, respectivamente.

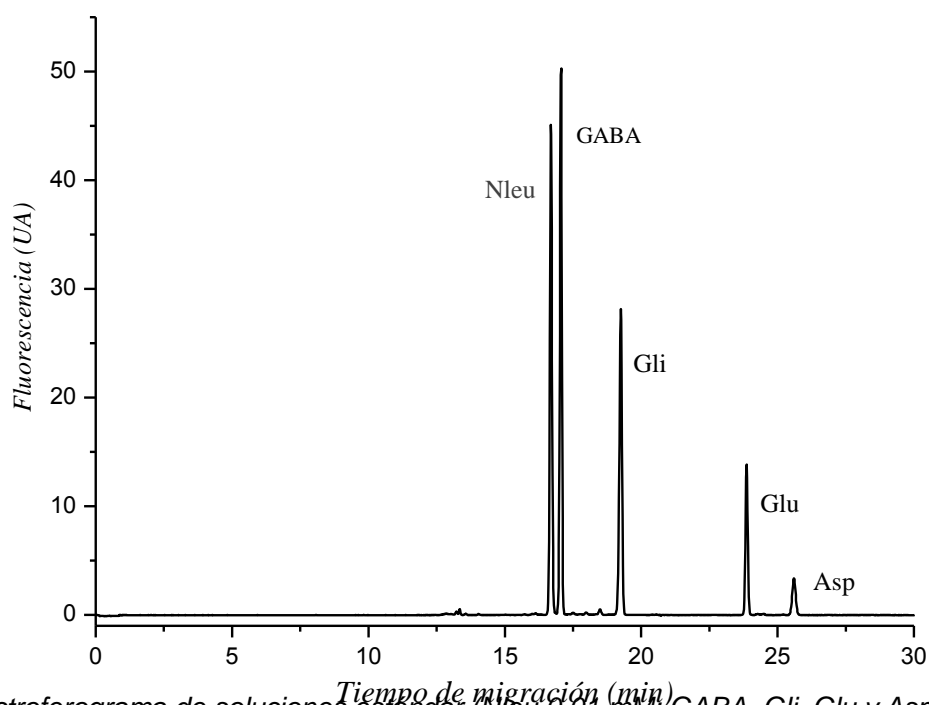


Fig. 12. Electroferograma de soluciones estándar (Nleu 0.01 mM, GABA, Gli, Glu y Asp 5 μ M) derivatizadas con CBQCA. BGE: AcBo 200 mM, β -CD 10 mM, pH 10.

8.3. Eficiencia de la separación

El número de platos teóricos (N) se determinó a partir del electroferograma mediante la fórmula siguiente:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2$$

Donde t_m es el tiempo de migración y $w_{1/2}$ es el ancho del pico a la mitad de la altura del pico.

Cuadro 3. Eficiencia de la separación				
Aminoácido	t_m (min)	Altura del pico (cm)	$w_{1/2}$ (min)	Nº platos teóricos
Nleu	16.7	45.9	0.12	107295.2
GABA	17.0	51.6	0.10	160106.0
Gli	19.3	28.3	0.15	91715.3
Glu	23.9	13.9	0.15	140644.6
Asp	25.6	3.4	0.18	112058.5

8.4. Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó con soluciones estándar de los aminoácidos en un rango de concentraciones de 1 a 20 μM . Como respuesta de la medición se consideró el cociente de las áreas de los picos del aminoácido y del estándar interno ($A_{\text{aminoácido}}/A_{\text{Neu}}$), en lugar de su altura o fluorescencia. Se aplicó el método del estándar interno pues se ha reportado que mejora significativamente la precisión de los resultados (Altria, 2002). A continuación se muestran las gráficas correspondientes (Fig. 13) y el resumen de los datos obtenidos en el Cuadro 4.

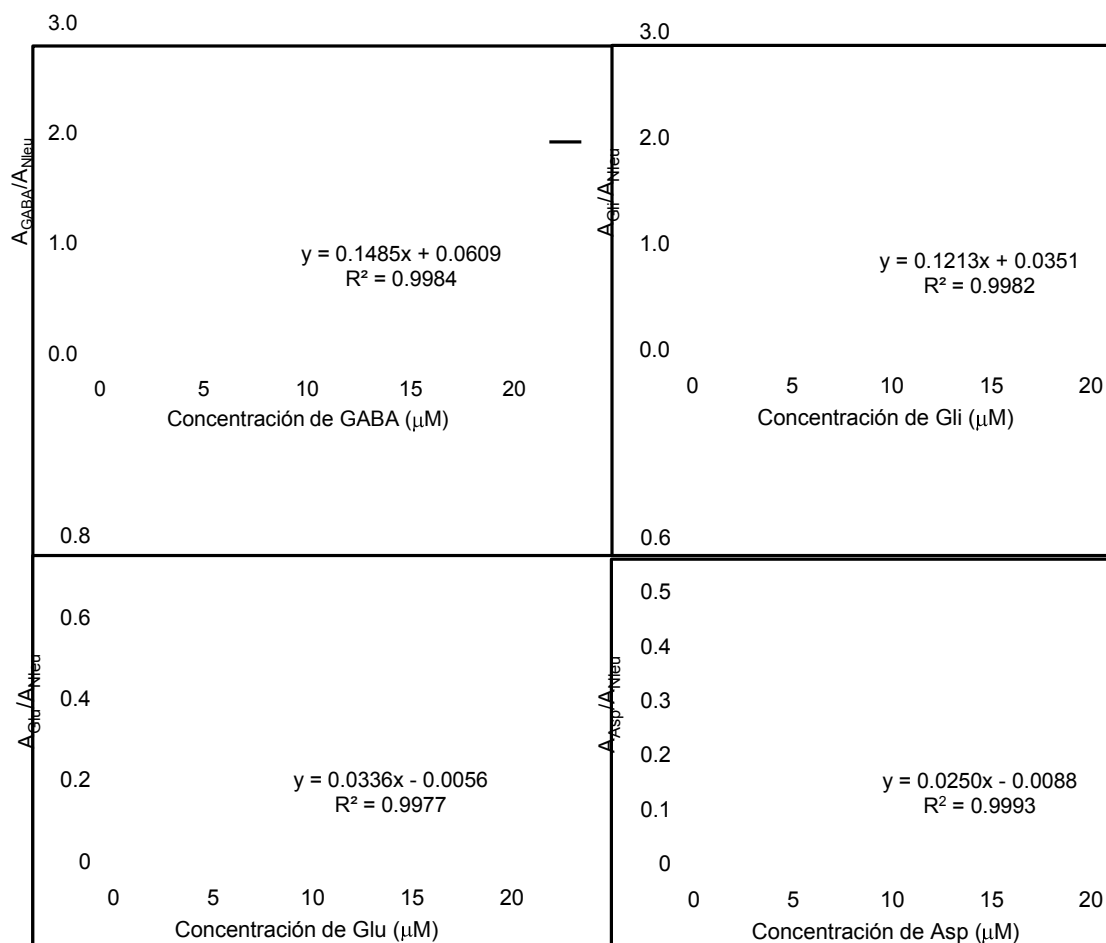


Fig. 13. Curvas de calibración del glutamato, aspartato, GABA y glicina.

Para los cuatro aminoácidos se obtuvo un coeficiente de correlación mayor a 0.99; por lo tanto, el método es lineal en el rango de concentraciones evaluado.

<i>Cuadro 4. Linealidad del método</i>			
Aminoácido	Coefficiente de correlación (R)	Pendiente (m)	Ordenada al origen (b)
GABA	0.9992	0.1458	0.0609
Gli	0.9991	0.1213	0.0351
Glu	0.9988	0.0336	-0.0056
Asp	0.9996	0.0250	-0.0088

8.5. Precisión del método

La repetibilidad del método analítico se evaluó bajo las condiciones de operación normal. La precisión, expresada como la desviación estándar relativa (DER), se calculó dividiendo la desviación estándar (DE) de la respuesta (relación de áreas) entre el promedio y multiplicando por 100.

<i>Cuadro 5. Precisión para el GABA</i>				
[GABA] (μM)	$A_{\text{GABA}}/A_{\text{Nleu}}$	$A_{\text{GABA}}/A_{\text{Nleu}}$ promedio	DE	DER %
1	0.2112 0.2192 0.2109	0.2138	4.71E-3	2.31
5	0.8411 0.8341 0.8237	0.8330	8.76E-3	1.03
10	1.6114 1.6120 1.5842	1.6025	0.0159	0.98
15	2.3398 2.3147 2.2829	2.3125	0.0285	1.23
20	2.9865 3.0146 2.9282	2.9764	0.0441	1.48

<i>Cuadro 6. Precisión para la Glicina</i>				
[Gli] (μM)	$A_{\text{Gli}}/A_{\text{Nleu}}$	$A_{\text{Gli}}/A_{\text{Nleu}}$ promedio	DE	DER %
1	0.1613 0.1669 0.1552	0.1611	5.85E-3	1.94

5	0.6764 0.6703 0.6631	0.6699	6.66E-3	0.89
10	1.3105 1.2934 1.2876	1.2972	0.0119	0.92
15	1.7813 1.8192 1.7831	1.7945	0.0214	1.19
20	2.5093 2.4609 2.4530	2.4744	0.0305	1.23

<i>Cuadro 7. Precisión para el Glutamato</i>				
[Glu] (μM)	$A_{\text{Glu}}/A_{\text{Nleu}}$	$A_{\text{Glu}}/A_{\text{Nleu}}$ promedio	DE	DER %
1	0.0268 0.0282 0.0271	0.0274	7.37E-4	1.92
5	0.1682 0.1724 0.1706	0.1704	2.11E-3	1.24
10	0.3098 0.3185 0.3215	0.3166	6.08E-3	1.98
15	0.4930 0.4751 0.4787	0.4823	9.47E-3	1.96
20	0.6880 0.6788 0.6833	0.6834	4.60E-3	0.67

<i>Cuadro 8. Precisión para el Aspartato</i>				
[Asp] (μM)	$A_{\text{Asp}}/A_{\text{Nleu}}$	$A_{\text{Asp}}/A_{\text{Nleu}}$ promedio	DE	DER %
1	0.0177 0.0190 0.0185	0.0184	6.56E-4	2.58
5	0.1203 0.1162 0.1194	0.1186	2.15E-3	1.82
10	0.2294 0.2404 0.2373	0.2357	5.67E-3	2.51

15	0.3554 0.3595 0.3667	0.3605	5.72E-3	1.59
20	0.5016 0.4984 0.4897	0.4966	6.16E-3	1.24

La repetibilidad del método fue adecuada ya que las DERs de las relaciones de áreas (respuesta) se encontraron en un rango de 0.69 a 2.58 %.

8.6. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) refieren la concentración mínima de un analito que puede ser detectada o cuantificada en una muestra, respectivamente, bajo las condiciones de operación establecidas. Para el cálculo del LOD y LOQ se graficó el área del pico en función de la concentración del aminoácido; de las curvas correspondientes se obtuvieron los valores de la desviación estándar de la regresión lineal ($s_{y/x}$) y la pendiente (m), los cuales se sustituyeron en las fórmulas siguientes:

$$\text{LOD} = 3(s_{y/x}/m)$$

$$\text{LOQ} = 10(s_{y/x}/m)$$

<i>Cuadro 9. Límites de detección y cuantificación</i>				
	Glu	GABA	Gli	Asp
$s_{y/x}$	0.0048	0.0219	0.0157	0.0041
m	76.9108	334.9677	257.2406	56.1759
LOD (nM)	0.18	0.19	0.18	0.22
LOQ (nM)	0.62	0.65	0.61	0.73

Los límites de detección de los aminoácidos de interés se encontraron en un intervalo de 0.18 a 0.22 nM, mientras que los límites de cuantificación estuvieron por abajo de 0.80 nM, siendo menores que las concentraciones de estos aminoácidos en las muestras de corteza prefrontal (CPF) inyectadas al sistema electroforético.

8.7. Cuantificación de aminoácidos en muestras de corteza prefrontal de rata

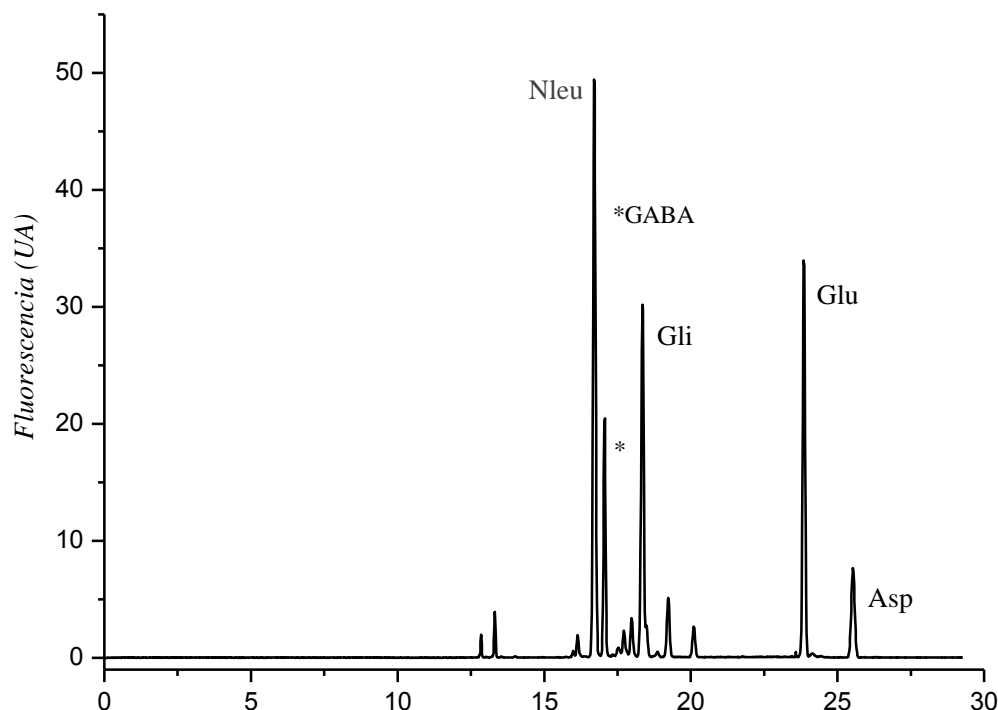
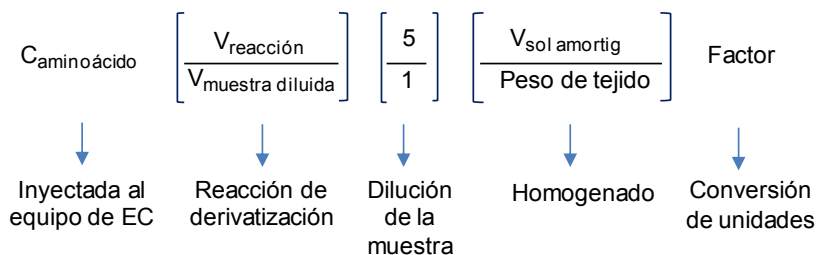


Fig. 14. Electroferograma de una muestra de CPF (grupo CC).

Para el cálculo de la concentración de los aminoácidos en las muestras de CPF se consideraron los valores de la pendiente (m) y ordenada al origen (b) de las curvas de calibración correspondientes (*Cuadro 4*), los factores de dilución utilizados y el peso del tejido, así como el factor de conversión de unidades requerido para expresar el resultado en términos de μmol aminoácido/g tejido.

$$(A_{\text{aminoácido}}/A_{\text{Nleu}}) = mC_{\text{aminoácido}} + b \quad \rightarrow \quad C_{\text{aminoácido}} = [(A_{\text{aminoácido}}/A_{\text{Nleu}}) - b] / m$$



Cuantificación en μmol aminoácido/g tejido:

$$C_{\text{aminoácido}} (\mu\text{M}) * (22.5\mu\text{L}/1.5\mu\text{L}) * (50\mu\text{L}/1\mu\text{L}) * (1\text{mL}/100 \text{ mg tejido}) * 0.01$$

A continuación se muestran los resultados de la cuantificación de los aminoácidos en las muestras de CPF pertenecientes a los 4 grupos experimentales: control de caja (CC), control del estrés (CE), privación de sueño MOR (PSM) y recuperación (REC).

<i>Cuadro 10. Glutamato en la CPF ($\mu\text{mol/g tejido}$)</i>				
Grupo	CC	CE	PSM	REC
	15.9928	16.7190	15.5537	12.2178
	15.3506	17.1399	13.1409	13.7871
	11.7889	18.6130	14.4120	14.2505
	13.2952	18.0053	14.4962	14.5320
		16.9740	14.4007	
Promedio	14.1069	17.4902	14.4007	13.6969
Error std	1.1123	0.3961	0.4276	0.5963

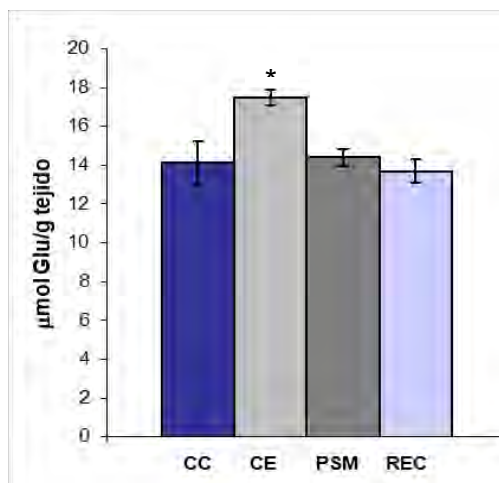


Fig. 15. Efecto del estrés y la privación del sueño MOR sobre los niveles de Glu. CC: control de caja, CE: control del estrés, PSM: privación de sueño MOR, REC: recuperación. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. Análisis estadístico: ANOVA, seguido de prueba Holm-Sidak. $F_{(0.05;3,14)}=10.093$. *Diferencia estadísticamente significativa de CE vs CC, PSM y REC.

<i>Cuadro 11. GABA en la CPF ($\mu\text{mol/g tejido}$)</i>				
Grupo	CC	CE	PSM	REC
	1.7653	1.8498	1.4465	1.8456
	1.1168	1.6342	1.5981	1.8470
	1.3748	2.5394	1.8032	1.3915
	2.1167	2.8459	1.8847	2.0140
	1.5124	1.7139	1.1754	1.2998
Promedio	1.5772	2.1166	1.5816	1.6796
Error std	0.1910	0.2712	0.1424	0.1571

Cuadro 12. Glicina en la CPF ($\mu\text{mol/g}$ tejido)				
Grupo	CC	CE	PSM	REC
	2.2694	2.3933	2.1945	1.6254
	1.5522	2.4651	1.7829	1.8931
	2.1599	2.7164	1.9997	1.9722
	1.8092	2.6127	2.0141	2.0202
	2.5877	2.4368	1.9978	
Promedio	2.0757	2.5249	1.9978	1.8777
Error std	0.2018	0.0676	0.0730	0.0881

Cuadro 13. Aspartato en la CPF ($\mu\text{mol/g}$ tejido)				
Grupo	CC	CE	PSM	REC
	8.6659	12.2131	8.7474	7.0016
	10.2548	14.4022	9.8835	5.9856
	8.0830	11.8778	8.7487	11.0257
	12.7439	14.1182	10.1577	10.6562
	6.1069		5.9188	
Promedio	9.1709	13.1528	8.6912	8.6673
Error std	1.4367	0.7455	0.9689	1.4714

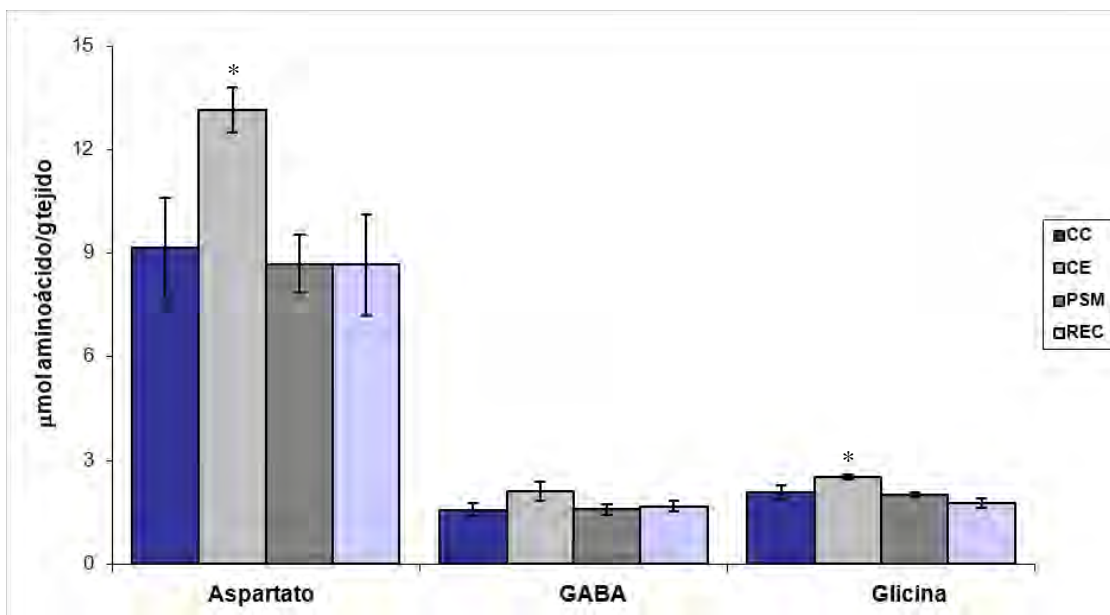


Fig. 16. Efecto del estrés y la privación del sueño MOR sobre los niveles de Asp, GABA y Gli. CC: control de caja, CE: control del estrés, PSM: privación de sueño MOR, REC: recuperación. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. Análisis estadístico: ANOVA, seguido de prueba Holm-Sidak. Asp, $F_{(0.05;3,14)}=4.490$; GABA, $F_{(0.05;3,16)}=2.120$; Gli, $F_{(0.05;3,15)}=6.291$. *Diferencia estadísticamente significativa de CE vs CC, PSM y REC.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1. Optimización de la separación electroforética

El objetivo de esta tesis fue desarrollar un método de EC para cuantificar glutamato (Glu) en muestras de corteza prefrontal (CPF) de rata. De manera simultánea, se logró determinar otros aminoácidos relevantes (GABA, glicina y aspartato). El punto de partida fue el método desarrollado por el QFB. Antonio Romano López, quien cuantificó GABA y Glu en muestras de hipocampo (HC) de rata mediante Cromatografía Electrocinética Micelar (MEKC) (Romano, 2008). El principio básico de la separación por EC es la migración diferencial de las especies iónicas con base en su relación carga/masa (movilidad electroforética) (Weinberger, 2000). Sin embargo, dicha relación no difiere significativamente entre moléculas con estructuras químicas similares (tal es el caso de los aminoácidos), lo que dificulta su separación. En este sentido, la MEKC resulta útil, pues a través de la adición de un agente tensoactivo al electrolito de fondo (BGE), introduce un mecanismo secundario de separación, que consiste en la distribución de los analitos entre la fase pseudoestacionaria micelar y la fase acuosa (Terabe, 2004). La MEKC acoplada a la detección por fluorescencia inducida por láser (LIF) se ha utilizado con frecuencia en la determinación de aminoácidos en diversas muestras biológicas (Deng *et al.*, 2008; Shou *et al.*, 2004). A pesar de las ventajas que ofrece la MEKC, se prefirió omitir la adición de dodecilsulfato de sodio (SDS, el agente tensoactivo más popular) al BGE con base en las siguientes observaciones: 1) al pH de separación (10), todos los derivados fluorescentes se encuentran ionizados (presentan carga negativa) y en consecuencia, migran hacia el cátodo; 2) el uso de un BGE con una concentración alta de ácido bórico fue suficiente para resolver adecuadamente aquellos derivados con movilidades electroforéticas parecidas (GABA y Nleu); 3) el pico de Glu que se obtiene al aplicar el método de Romano (2008), es pequeño y ancho.

Para favorecer la eficiencia y sensibilidad del método en la determinación del Glu, se decidió incorporar un aditivo al BGE, además de los boratos. Se eligió la β -ciclodextrina (β -CD), utilizada con frecuencia en las separaciones enantioméricas (Zhao *et al.*, 2005) o basadas en la MEKC (Chen *et al.*, 2001; Sauvinet *et al.*, 2003; Ehlen *et al.*, 2005), que además se ha reportado que intensifica la fluorescencia de los derivados de naftaleno-2,3-dicarboxaldehído (NDA) (Church *et al.*, 1997; Zhang & Sun, 2007).

Los efectos positivos que se obtuvieron mediante la adición de la β -CD al BGE fueron:

- a) La obtención de picos muy finos, lo que se refleja en un número alto de platos teóricos.
- b) La intensificación de la fluorescencia, lo que indica una mayor sensibilidad del método.
- c) La disminución del tiempo de migración de los analitos.

La capacidad de las CDs para formar complejos de inclusión depende del tamaño de su cavidad hidrofóbica, así como de la fuerza de las interacciones (no covalentes) entre la CD y la molécula huésped (Chankvetadze, 1997). Los efectos benéficos del uso de la β -CD sugieren que los analitos hidrofóbicos de estudio (CBQCA-aminoácido) se adaptaron a la dimensión de la cavidad de la β -CD, y que probablemente, una interacción fuerte y estable entre los derivados fluorescentes y la CD provocó que el analito pasara más tiempo en el complejo que libre, reduciendo así su coeficiente de difusión, lo que a su vez mejoró la eficiencia de la separación.

También se observó que conforme la concentración de β -CD aumenta en el BGE, se obtienen picos más estrechos y altos. Este hecho sustenta la hipótesis de que entre mayor es el número de moléculas de CD disponibles para la formación de complejos de inclusión, menor es el número de moléculas libres de analito y el grado de dispersión molecular. El resultado global fue el estrechamiento de las zonas de los analitos, lo que se tradujo en picos más finos. Para explicar el aumento de la intensidad de la fluorescencia se puede considerar que mientras más tiempo tarda un analito (zona) frente al detector, mayor es la altura del pico generado. Es lógico pensar que entre más grande es una molécula (complejo CD-analito vs analito libre), menor es su movilidad electroforética. Respecto a la disminución del tiempo de migración, es importante tomar en cuenta que la formación de los complejos de inclusión altera la relación carga/masa de los analitos y por ende, afecta su movilidad electroforética (Chankvetadze, 1997). Cuando el analito se encuentra embebido en la cavidad de la CD, su carga negativa queda parcialmente enmascarada (disminuye) y al mismo tiempo presenta un mayor tamaño. El resultado neto es la disminución de su movilidad electroforética (la cual tiene signo negativo porque se opone a la dirección del FEO) y en consecuencia, hay un aumento de su movilidad aparente (en dirección al cátodo, donde se encuentra el detector). La disminución del tiempo de migración también fue proporcional a la concentración de β -CD en el BGE.

Para favorecer la adición de una mayor cantidad de β -CD sin afectar la resolución de los derivados de GABA y Nleu, se disminuyó la velocidad del FEO a través de las siguientes medidas: 1) la utilización de una concentración alta de ácido bórico (200 mM) en el BGE, 2) un pH de separación relativamente alto, 3) un voltaje de separación moderado (18 kV).

9.2. Efecto del estrés y la privación del sueño MOR sobre los niveles de glutamato en la corteza prefrontal de la rata

Es importante considerar que las mediciones se realizaron en muestras de tejido, por lo cual no es posible distinguir entre el Glu citoplásmico, vesicular o extracelular; los resultados

corresponden al Glu total.

El resultado más evidente fue el aumento de la concentración de Glu inducido por el estrés en el grupo CE. Se sabe que la CPF es extremadamente sensible al estrés (McEwen, 2007), que incluso la exposición a un estrés moderado puede deteriorar rápidamente las funciones de la CPF en humanos y animales (Arnsten, 2009b). Además, la CPF participa en los mecanismos de regulación de la respuesta al estrés, mediada por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) (Cerqueira *et al.*, 2008). Varios tipos de estrés agudo provocan la elevación del Glu extracelular en la CPF (Gilad *et al.*, 1990; Moghaddam, 1993; Bagley & Moghaddam, 1997). El estrés crónico en la rata tiene efectos negativos, por ejemplo, el deterioro de la memoria de trabajo y la flexibilidad conductual, procesos atribuidos a la CPF (Cerqueira *et al.*, 2007), así como la alteración morfológica neuronal del HC y la CPF. Específicamente, en la CPFm de la rata, el estrés crónico produce la retracción de las ramas dendríticas apicales de las capas II y III de las células piramidales, así como la pérdida de espinas de estas neuronas (Radley *et al.*, 2004; 2006). Este fenómeno es reversible, al menos parcialmente, ya que se confirmó la reextensión de las dendritas apicales tras un período de recuperación post-estrés (Radley *et al.*, 2005).

La elevación de los niveles de corticosterona (CORT) en la rata (cortisol en humanos) es parte de la respuesta mediada por el eje HPA ante una situación de estrés (de Kloet *et al.*, 2005). La unión de la CORT a los receptores de glucocorticoides (GRs) en la CPF, parece estar relacionada con el aumento de la liberación sináptica de Glu (Mussazi *et al.*, 2010) y la intensificación de la transmisión glutamatérgica (Yuen *et al.*, 2009), ya que ambos efectos inducidos por el estrés, fueron prevenidos por un antagonista específico de los GRs (RU486). Asimismo, la adrenalectomía en la rata revirtió el aumento del Glu extracelular provocado por el estrés en la CPF (Moghaddam *et al.*, 1994). Sin embargo, no se conocen los mecanismos por los cuales la CORT favorece la liberación del Glu.

Con base a la información antes expuesta, el aumento del Glu en la CPF tras un período largo de estrés (72 h) podría asociarse a niveles altos de CORT. Probablemente, esta elevación del Glu contribuye a los cambios estructurales de la CPF ya referidos, si se considera que los bloqueadores del receptor NMDA han mostrado eficacia para evitar la atrofia del HC provocada por el estrés crónico (revisado en McEwen & Magarinos, 1997). Los antagonistas de los GRs también tienen efectos positivos en este sentido, quizá porque indirectamente limitan la liberación de Glu.

Asimismo, se sabe que durante una actividad glutamatérgica intensa (como la que desencadena

una situación de estrés) se incrementa el contenido tisular de Glu (Hertz, 2006), lo cual implica que su síntesis *de novo* en astrocitos excede su degradación. Los niveles altos de Glu en el espacio extracelular están acoplados a un mayor consumo de glucosa en astrocitos. La recaptura del Glu, mediada principalmente por los transportadores gliales (GLT-1 y GLAST), es dirigida por el cotransporte de 3 Na⁺ y 1 H⁺, y el antiporte de 1 K⁺; para reestablecer los gradientes iónicos, se activa la ATPasa Na⁺/K⁺, cuya actividad depende de ATP. Además, gran parte del Glu que entra a los astrocitos es convertido a glutamina (Gln) por la glutamina sintetasa, enzima que también usa ATP. Estos requerimientos de ATP son sustentados principalmente por la oxidación de la glucosa, pero el Glu también puede ser degradado oxidativamente para proveer energía. De hecho, el ciclo Glu-Gln no es estequiométrico, una molécula de Glu solo se recicla 1 a 2 veces antes de ser degradada (Hertz, 2006). En general, la actividad glutamatérgica tiene un costo energético elevado para el mantenimiento de diferentes procesos: los potenciales de acción, la liberación y recaptura del Glu, el ciclo Glu-Gln, así como el reestablecimiento de los potenciales de membrana tras la actividad excitatoria pre- y post-sináptica (Bovento *et al.*, 2002). Se piensa que la mayor parte de la energía que consume el cerebro (por lo menos en la corteza cerebral), es para soportar la neurotransmisión glutamatérgica. En este sentido, es muy probable que el cerebro, y en especial una región tan sensible e importante como la CPF, se prepare durante los periodos de menor actividad glutamatérgica (sueño NMOR), sintetizando Glu en exceso para enfrentar las demandas energéticas tanto neuronales como astrocíticas que le impone una vigilia en condiciones de estrés. El sueño NMOR podría tener un papel fundamental en la recuperación de los componentes celulares involucrados en la actividad glutamatérgica y el reabastecimiento de Glu en los diferentes compartimentos celulares.

Entre el grupo control (CC) y el privado de sueño MOR (PSM) no se observó una diferencia significativa en la concentración del Glu. Este resultado es sorprendente porque sugiere que la historia de sueño es un elemento clave para determinar los niveles de Glu en la CPF. Es decir, el estrés (grupo CE) provoca un aumento en la concentración del Glu total, pero este efecto no es evidente cuando la rata está simultáneamente estresada y privada de sueño MOR (grupo PSM). Esto sugiere que la necesidad de dormir, acumulada durante 72 h de privación de sueño MOR, revierte el efecto del estrés sobre los niveles de Glu.

La determinación del Glu en el espacio extracelular durante los estados de sueño y vigilia, se ha llevado a cabo en distintas estructuras cerebrales (corteza orbitofrontal, hipotálamo, cortezas prefrontal y motora) con resultados consistentes, niveles altos de Glu durante el sueño MOR y la vigilia, y niveles bajos durante el sueño NMOR (López-Rodríguez *et al.*, 2007; John *et al.*, 2008;

Dash *et al.*, 2009). El estudio realizado por Dash y col. (2009) es de interés particular, ya que además de confirmar una fluctuación constante del Glu a lo largo del ciclo sueño-vigilia en la CPF (con un incremento neto durante la vigilia y el sueño MOR, y un decremento neto durante el sueño NMOR), reconoce la influencia de la somnolencia (que se manifiesta por el aumento de los intentos por dormir conforme se prolonga la vigilia) sobre los niveles del Glu, independientemente del estado conductual (vigilia o sueño). Específicamente, el grupo de Dash observa que tras 3 h de privación de sueño total, el Glu extracelular en la CPF no sigue aumentando, como es la tendencia durante la vigilia, sino que empieza a decaer. Por lo tanto, una presión de sueño alta es capaz de modular los cambios del Glu asociados con el estado conductual. Además, enfatiza la idea de que la alternancia entre la vigilia/sueño MOR y el sueño NMOR, permite mantener la homeostasis del Glu en el espacio extracelular a largo plazo (a través del ciclo sueño-vigilia).

En este contexto, se puede explicar la ausencia de cambio en los niveles de Glu en el grupo PSM con respecto al grupo CC, a pesar del estrés inherente al protocolo de privación de sueño MOR. En el grupo PSM, el efecto del estrés sobre los niveles del Glu (tendencia a aumentar) pudo haber sido contrarrestada por una presión de sueño elevada (tendencia a disminuir), por lo cual no se registró un cambio neto. Como la privación del sueño fue parcial (selectiva del sueño MOR), la concentración del Glu no cayó por abajo de los niveles observados en el grupo CC, ya que las ratas tenían acceso a cierta cantidad de sueño NMOR (probablemente disminuida debido a la fragmentación del sueño y a los intentos cada vez más fuertes por entrar en sueño MOR), lo cual les permitió restaurar sus reservas de Glu y así compensar los efectos de una vigilia prolongada. En contraste, el efecto del estrés en las ratas que podían dormir (grupo CE) no fue obstaculizado, ya que la presión de sueño en este grupo era baja.

Estos resultados sugieren que la homeostasis del Glu a largo plazo, propuesta por Dash y col. (2009), no es exclusiva del espacio extracelular sino que afecta el Glu total y es mediada por un ciclo sueño-vigilia espontáneo normal (sin privación del sueño). Si esta interpretación es correcta, tener un sueño suficiente y regular es muy importante, ya que la privación de sueño afectaría la intensidad y efectividad de la respuesta al estrés dirigida por la CPF. Sin embargo, es necesario profundizar en los aspectos moleculares de esta hipótesis para comprender mejor el fenómeno del sueño y su papel fisiológico. Por el momento, sólo se puede afirmar que el funcionamiento adecuado de la CPF (y del cerebro en general) depende de la actividad mediada por el Glu, porque además de ser el neurotransmisor excitador principal, está asociado fuertemente con el metabolismo energético cerebral. De hecho, la patofisiología de diversos padecimientos neurodegenerativos y neurológicos, como la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson, la

esclerosis lateral amiotrófica, la epilepsia y la isquemia cerebral, se ha relacionado con una disfunción del sistema glutamatérgico (Raol *et al.*, 2001; Sheldon & Robinson, 2007; Walton & Dodd, 2007;). Asimismo, varios desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia, la depresión y el desorden de estrés post-traumático, que se caracterizan por la disfunción de la CPF (Arnsten, 2009a), también se han vinculado con una alteración glutamatérgica (Gluck *et al.*, 2002; Valentine & Sanacora, 2009).

El caso del aspartato (Asp) y la glicina (Gli) fue semejante al del Glu, es decir, se registró una mayor concentración de dichos aminoácidos en la CPF de las ratas sometidas a estrés (grupo CE) con respecto al resto de los grupos. El Asp participa en diversas rutas metabólicas y al igual que el Glu, es un neurotransmisor excitador e interactúa con el receptor NMDA de Glu (Farooqui *et al.*, 2008). Por su parte, la Gli es el principal neurotransmisor inhibitorio de la médula espinal y el tallo cerebral, sin embargo, en el cerebro anterior es coagonista obligado del receptor NMDA, y en consecuencia, su actividad es excitatoria en esta región (Hernandes & Troncone, 2009). En este sentido, la Gli es un componente del sistema glutamatérgico. Si este último presenta una mayor actividad bajo condiciones de estrés, el aumento de los niveles de Gli en la CPF es congruente.

La concentración de GABA no aumentó significativamente debido al estrés (grupo CE), como ocurrió con los otros aminoácidos (Glu, Asp y Gli). Al contrario, se esperaba que los niveles del GABA, el neurotransmisor inhibitorio más importante del cerebro anterior (Waagepetersen *et al.*, 2007), se vieran afectados en la misma dirección que el Glu, porque se sabe que la activación de la transmisión glutamatérgica induce la activación de la contraparte inhibitoria. Sin embargo, sólo se observó una tendencia en esta dirección, y no se puede asegurar que sea un efecto real (no atribuible a la variabilidad biológica).

La mayoría de las enfermedades del cerebro tienen un componente genético, sin embargo, el factor ambiental es decisivo para su desarrollo. En este sentido, el estilo de vida actual favorece tanto el estrés como la privación del sueño. Los resultados obtenidos sugieren que el estrés afecta la homeostasis del Glu, que a su vez determina el funcionamiento normal del cerebro, y que la privación del sueño interfiere con la respuesta al estrés, que bajo ciertas circunstancias es crucial. De ahí la importancia de evitar que estas condiciones (estrés y falta de sueño) se vuelvan crónicas en nuestra vida cotidiana, pues los cambios neuroquímicos que favorecen, eventualmente podrían conducir a patologías del SNC.

10. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método confiable de EC para separar y cuantificar Glu, GABA, Gli y Asp, el cual se aplicó al análisis de muestras de CPF de ratas estresadas y privadas de sueño MOR. Se estableció la composición del electrolito de fondo (AcBo 200 mM, β -CD 10 mM, pH 10) utilizado para la separación electroforética, así como la temperatura (25 °C) y el voltaje (18 kV) óptimos. El uso de la β -CD como aditivo del BGE disminuyó el tiempo de análisis, mejoró la eficiencia de la separación e intensificó la señal fluorescente de los derivados de CBQCA. Los niveles de los aminoácidos implicados en la neurotransmisión excitatoria (Glu, Asp y Gli) se elevaron en la CPF de las ratas sometidas a estrés, pero no se registró cambio cuando el estrés se acompañó de la privación del sueño MOR.

11. REFERENCIAS

- Alhola P & Polo-Kantola P (2007) Sleep deprivation: impact on cognitive performance. *Neuropsychiatr Dis Treat* 3(5), 553-67.
- Altria KD (2002) Improved performance of capillary electrophoresis using internal standards. *CE Currents* Sep, 1-5.
- Alvarenga TA, Patti CL, Andersen ML, Silva RH, Calzavara MB, López GB, Frussa-Filho R, Tufik S (2008) Paradoxical sleep deprivation impairs acquisition, consolidation, and retrieval of discriminative avoidance task in rats. *Neurobiol Learn Mem* 90, 624-32.
- Arnsten AFT (2009a) Ameliorating prefrontal cortical dysfunction in mental illness: inhibition of phosphatidylinositol-protein C signaling. *Psychopharmacol* 202, 445-55.
- Arnsten AFT (2009b) Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci* 10, 410-22.
- Arriaga EA, Zhang Y, Dovichi NJ (1995) Use of 3-(p-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde to label amino acids for high-sensitivity fluorescence detection in capillary electrophoresis. *Anal Chimica Acta* 299, 319-26.
- Bagley J & Moghaddam B (1997) Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. *Neurosci* 77(1), 65-73.
- Banks S & Dinges DF (2007) Behavioral and physiological consequences of sleep restriction. *J Clin Sleep Med* 3(5), 519-28.
- Bardelmeijer HA, Lingeman H, de Ruiter C, Underberg WJM (1998) Derivatization in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 807, 3-26.
- Beart PM & O'Shea RD (2007) Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol* 150, 5-17.
- Beckers JL & Bocek P (2003) The preparation of background electrolytes in capillary zone electrophoresis: golden rules and pitfalls. *Electrophoresis* 24, 518-35.
- Bergquist J, Gilman SD, Ewing AG, Ekman R (1994) Analysis of human cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem* 66, 3512-18.
- Bergquist J, Vona MJ, Stiller C-O, O'Connor WT, Falkenberg T, Ekman R (1996) Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: a sensitive method for monitoring extracellular concentrations of amino acids in the periaqueductal grey matter. *J Neurosci Methods* 65, 33-42.
- Bert L, Parrot S, Robert F, Desvignes C, Denoroy L, Suaud-Chagny M-F, Renaud B (2002) In vivo temporal sequence of rat striatal glutamate, aspartate and dopamine efflux during apomorphine, nomifensine, NMDA and PDC in situ administration. *Neuropharmacol* 43, 825-35.
- Boulat O, McLaren DG, Arriaga EA, Chen DDY (2001) Separation of free amino acids in human plasma by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence: potential for emergency

diagnosis of inborn errors of metabolism. *J Chromatography B* 754, 217-28.

Bovento G, Sibson N, Pellerin L (2002) Does glutamate image your thoughts? *Trends Neurosci* 25(7), 359-64

Braun AR, Balkin TJ, Wesensten NJ, Carson RE, Varga M, Baldwin P, Selbie S, Belenky G, Herscovitch P (1997) Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle. An H₂¹⁵O PET study. *Brain* 120, 1173-1197.

Camacho A & Massieu L (2006) Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 37, 11-18.

Castillo, Revilla, López, Rivera (2005) *Fundamentos de Electroforesis Capilar*. UNAM FES Cuautitlán, México. 180 p.p.

Chankvetadze B (1997) *Capillary electrophoresis in chiral analysis*. John Wiley & Sons, England. p. 5-71, 143-147.

Castner SA, Goldman-Rakic PS, Williams GV (2004) Animal models of working memory: insights for targeting cognitive dysfunction in schizophrenia. *Psychopharmacol* 174, 111-25.

Cerqueira JJ, Mailliet F, Almeida OFX, Jay TM, Sousa N (2007) The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci* 27(11), 2781-87.

Cerqueira JJ, Almeida OFX, Sousa N (2008) The stressed prefrontal cortex. Left? Right! *Brain Behav Immun* 22, 630-38.

Chen Z, Wu J, Baker GB, Parent M, Dovichi NJ (2001) Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to the determination of biogenic amines and amino acids in brain microdialysate and homogenate samples. *J Chromatogr A* 914, 293-98.

Church WH, Lee SC, Dranchak KM (1997) Capillary electrophoresis of glutamate and aspartate in rat brain dialysate. Improvements in detection and analysis time using cyclodextrins. *J Chromatogr B* 700, 67-75.

Cirelli C & Tononi G (2000) Gene expression in the brain across the sleep-waking cycle. *Brain Res* 885, 303-21.

Cirelli C (2005) A molecular window on sleep: changes in gene expression between sleep and wakefulness. *Neuroscientist* 11(1), 63-74.

Cirelli C, Faraguna U, Tononi G (2006) Changes in brain gene expression after long-term sleep deprivation. *J Neurochem* 98, 1632-45.

Cirelli C (2009) The genetic and molecular regulation of sleep: from fruit flies to humans. *Nat Rev Neurosci* 10, 549-60.

Daikhin Y & Yudkoff M (2000) Compartmentation of brain glutamate in neurons and glia. *J Nutr* 130 (4S Suppl), 1026S-31S.

Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 771-84.

- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65, 1-105.
- Dash MB, Douglas CL, Vyazovskiy VV, Cirelli C, Tononi G (2009) Long-term homeostasis of extracellular glutamate in the rat cerebral cortex across sleep and waking states. *J Neurosci* 29, 620-29.
- Dash PK, Moore AN, Kobori N, Runyan D (2007) Molecular activity underlying working memory. *Learn Mem* 14, 554-63.
- Datta S & MacLean RR (2007) Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 31(5), 775-824.
- Deng Y-H, Wang H, Zhang H-S (2008) Determination of amino acid neurotransmitters in human cerebrospinal fluid and saliva by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Sep Sci* 31, 3088-97.
- Ehlen JC, Albers HE, Breyer ED (2005) MECK-LIF of γ -amino butyric acid in microdialysate: systematic optimization of the separation conditions by factorial analysis. *J Neurosci Methods* 147, 36-47.
- Erecinska M & Silver IA (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Progr Neurobiol* 35, 245-96.
- Farooqui AA, Ong W-Y, Horrocks LA (2008) *Neurochemical aspects of excitotoxicity*. Springer, USA. p. 1-16.
- Foster AC & Kemp JA (2006) Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Op Pharmacol* 6, 7-17.
- Gluck MR, Thomas RG, Davis KL, Haroutunian V (2002) Implications for altered glutamate and GABA metabolism in the dorsolateral prefrontal cortex of aged schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 159(7), 1165-73.
- Hara MR & Snyder SH (2007) Cell signaling and neuronal death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 117-41.
- Harris DC (2005) *Exploring Chemical Analysis*. W.H. Freeman & Company, USA. p. 505-13.
- Harvey D (2000) *Modern Analytical Chemistry*. McGraw Hill, USA. p. 597-607.
- Hennevin E, Hars B, Maho C, Bloch V (1995) Processing of learned information in paradoxical sleep: relevance for memory. *Behav Brain Res* 69, 125-35.
- Hernandes MS & Troncone LRP (2009) Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review. *J Neural Transm* 116, 1551-60.
- Hertz L & Zielke HR (2004) Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci* 27(12), 735-43.
- Hertz L (2006) Glutamate, a neurotransmitter – and so much more. A synopsis of Wierzba *///*. *Neurochem Int* 48, 416-25.

Holmes A & Wellman CL (2009) Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 33, 773-83.

Huang YH & Bergles DE (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Op Neurobiol* 14, 346-52.

Huber R, Ghilardi MF, Massimini M, Tononi G (2004) Local sleep and learning. *Nature* 430, 78-81.

Imeri L. & Opp M. R. (2009) How (and why) the immune system makes us sleep. *Nat Rev Neurosci* 10, 199-210.

John J, Ramanathan L, Siegel JM (2008) Rapid changes in glutamate levels in the posterior hypothalamus across sleep-wake states in freely behaving rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R2041-49.

Khaledi MG (ed) (1998) *High-performance capillary electrophoresis: theory, techniques, and applications*. John Wiley & Sons, EUA. 1047 p.p.

de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 463-75.

Kolb B & Whishaw IQ (2009) *Fundamentals of human neuropsychology*. 6^a ed. Worth Publishers, USA. 707-731.

Krueger JM, Rector DM, Roy S, Van Dongen HPA, Belenky G, Panksepp J (2008) Sleep as a fundamental property of neuronal assemblies. *Nat Rev Neurosci* 9, 910-19.

Landers JP, ed (1996) *Handbook of Capillary Electrophoresis*. CRC, USA.

Lauer HH & Rozing GP (2009) *High Performance Capillary Electrophoresis*. Agilent Technologies, Germany. 174 p.p.

Li Y-M, Qu Y, Vandebussche E, Arckens L, Vandesande F (2001) Analysis of extracellular α -aminobutyric acid, glutamate and aspartate in cat visual cortex by in vivo microdialysis and capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection. *J Neurosci Methods* 105, 211-15.

Liu J, Hsieh Y-Z, Wiesler D, Novotny M (1991) Design of 3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxaldehyde as a reagent for ultrasensitive determination of primary amines by capillary electrophoresis using laser fluorescence detection. *Anal Chem* 63, 408-12.

López-Rodríguez F, Medina-Ceja L, Wilson CL, Jhung D, Morales-Villagran A (2007) Changes in extracellular levels in rat orbitofrontal cortex during sleep and wakefulness. *Arch Med Res* 38, 52-5.

Luong JHT & Nguyen AL (1997) Achiral selectivity in cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 792, 431-44.

Maquet P (1995) Sleep function(s) and cerebral metabolism. *Behav Brain Res* 69, 75-83.

Maquet P, Péters J-M, Aerts J, Delfiore G, Degueldre C, Luxen A, Franck G (1996) Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature* 383, 163-66.

- Maquet P (2000) Experience-dependent changes in cerebral activation during REM sleep. *Nat Neurosci* 3(8), 831-36
- McEwen BS & Magarinos AM (1997) Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 21, 271-84.
- McEwen BS (2006) Sleep deprivation as a neurobiological and physiologic stressor: allostasis and allostatic load. *Metabolism* 55 (Suppl 2), S20-23.
- McEwen BS (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87, 873-904.
- McKenna MC (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* 85, 3347-58.
- Miller DB, O'Callaghan JP (2006) The pharmacology of wakefulness. *Metabolism* 55 (Suppl 2), S13-19.
- Miller EK & Cohen JD (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function. *Ann Rev Neurosci* 24, 167-202.
- Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T (2001) Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinol* 26, 443-59.
- Moghaddam B (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison ton hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem* 60(5), 1650-57.
- Moghaddam B, Bolinao ML, Stein-Behrens B, Sapolsky R (1994) Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res* 655, 251-54.
- Moghaddam B (2002) Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 51, 775-87.
- Musazzi L, Milanese M, Farisello P, Zappettini S, Tardito D, Barbiero VS, Bonifacino T, Mallei A, Baldelli P, Racagni G, Raiteri M, Benfenati F, Bonanno G, Popoli M (2010) Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS ONE* 5(1), e8566:1-11.
- Muzur A, Pace-Schott EF, Hobson JA (2002) The prefrontal cortex in sleep. *Trends Cog Sci* 6 (11), 475-81.
- Nofzinger EA, Mintun MA, Wiseman MB, Kupfer DJ, Moore RY (1997) Forebrain activation in REM sleep: an FDG PET study. *Brain Res* 770, 192-201.
- Pellerin L & Magistretti PJ (2004) Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *The Neuroscientist* 10(1), 53-62.
- Pobozy W, Czarkowska W, Trojanowicz M (2006) Determination of amino acids in saliva using capillary electrophoresis with fluorometric detection. *J Biochem Biophys Methods* 67, 37-47.

Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2004) Chronical behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neurosci* 125, 1-6.

Radley JJ, Rocher AB, Janssen WG, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2005) Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Exp Neurol* 196, 199-203.

Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WG, Liston C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2006) Repeated stress induced spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 16, 313-20.

Raol YH, Lynch DR, Brooks-Kayal AR (2001) Role of excitatory amino acids in developmental epilepsies. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7(4), 254-60.

Ribeiro S, Goval V, Mello CV, Pavlides C (1999) Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. *Learn Mem* 6, 500-08

Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Gilliland MA (1989) Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep* 12, 68-87.

Romcy-Pereira RN, Erraji-Benchekroun L, Smymiotopoulos P, Ogawa S, Mello CV, Sibille E, Pavlides C (2009) Sleep-dependent gene expression in the hippocampus and prefrontal cortex following long-term potentiation. *Physiol Behav* 98, 44-52

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Prado CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger M, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675-86.

Sauvinet V, Parrot S, Benturquia N, Bravo-Moratón E, Renaud B, Denoroy L (2003) *In vivo* simultaneous monitoring of γ -aminobutyric acid, glutamate, and L-aspartate using brain microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: analytical developments and *in vitro/in vivo* validations. *Electrophoresis* 24, 3187-96.

Scharf M, Naidoo N, Zimmerman JE, Pack AI (2008) The energy hypothesis of sleep revisited. *Prog Neurobiol* 86, 264-80.

Shabir GA (2003) Validation of high-performance liquid chromatographic methods for pharmaceutical analysis. *J Chromatogr* 987, 57-66.

Shou M, Smith AD, Shackman JG, Peris J, Kennedy RT (2004) *In vivo* monitoring of amino acids by microdialysis sampling with on-line derivatization by naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde and rapid micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Neurosci Methods* 138, 189-97.

Sheldon AL & Robinson MB (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* 51(6-7), 333-55.

Siegel JM (2001) The REM sleep-memory consolidation hypothesis. *Science* 294, 1058-1063.

Siegel JM (2003) Why we sleep. *Sci Am* 289(5), 92-97.

Skoog DA, Holler FJ & Nieman TA (1998) *Principles of Instrumental Analysis*. Thomson Learning, USA. p. 778-795.

- Swick TJ (2005) The neurology of sleep. *Neurol Clin* 23, 967-89.
- Terabe S (2004) Micellar Electrokinetic Chromatography. *Anal Chem* 76(13), 241A-246A.
- Tsai G & Coyle JT (2002) Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 165-79.
- Thomas M, Sing H, Belenky G, Holcomb H, Mayberg H, Dannals R, Wagner H Jr, Thorne D, Popp K, Rowland L, Welsh A, Balwinski S, Redmond D (2000) Neuronal basis of alertness and cognitive performance impairments during sleepiness. I. Effects of 24 h of sleep deprivation on waking human regional brain activity. *J Sleep Res* 9, 335-52.
- Ummadi M & Weimer BC (2002) Use of capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence for attomole detection of amino acids. *J Chromatogr A* 964, 243-53.
- Valentine GW & Sanacora G (2009) Targeting glial physiology and glutamate cycling in the treatment of depression. *Biochem Pharmacol* 78(5), 431-39.
- Walker MP & Stickgold R (2004) Sleep-dependent learning and memory consolidation. *Neuron* 44, 121-33.
- Walton HS & Dodd PR (2007) Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 50, 1052-66.
- Wang C, Zhao S, Yuan H, Xiao D (2006) Determination of excitatory amino acids in biological fluids by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting diode induced fluorescence detection. *J Chromatogr B* 833, 129-34.
- Weinberger R (2000) *Practical Capillary Electrophoresis*. Academic, USA. 462 p.p.
- Yoo S-S, Hu PT, Gujar N, Jolesz FA, Walker MP (2007) A deficit in the ability to form new human memories without sleep. *Nat Neurosci* 10(3), 385-392.
- Yuen EY, Liu W, Karatsoreos IN, Feng J, McEwen BS, Yan Z (2009) Acute stress enhances glutamatergic transmission in PFC and facilitates working memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (33), 14075-79.
- Zerangue N & Kavanaugh MP (1996) Flux coupling in neuronal glutamate transporter. *Nature* 383, 634-37.
- Zhang L-Y & Sun M-X (2007) Capillary electrophoresis of phosphorylated amino acids with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 859, 30-36.
- Zhao S, Song Y, Liu Y-M (2005) A novel capillary electrophoresis method for the determination of D-serine in neural samples. *Talanta* 67, 212-16.
- Zisapel N (2007) Sleep and sleep disturbances: biological basis and clinical implications. *Cell Mol Life Sci* 64, 1174-1186.