UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD JURIQUILLA

MONTAJE, ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA DE HISTAMINA POR HPLC-FLUORESCENCIA EN DIALIZADOS DE RATAS EN LIBRE MOVIMIENTO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NEUROCIENCIAS

PRESENTA:
JONATHAN JOSÉ GUTIÉRREZ LEDEZMA

TUTORA:
DRA. MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. VERÓNICA RODRÍGUEZ CÓRDOVA
DRA. MARISOL DE LA MORA CURIEL
DR. JORGE HUMBERTO LIMÓN PACHECO
DRA. MARIE CHRISTINE ALINE BEDOS

ENES
JURIQUILLA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, MÉXICO (ENES JURIQUILLA) 2023

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

RESUMEN

Este trabajo describe los antecedentes y procesos para las condiciones más ideales del montaje de una técnica cromatográfica y de detección del neurotransmisor histamina; de tal forma se evaluó diferentes componentes de la fase móvil y diferente concentración de derivatizante O-ftalaldehído (**OPA**) para la detección de histamina usando cromatografía líquida de alta resolución (**HPLC**) y detección por fluorescencia (**FL**). Una vez establecido el método más adecuado, se estandarizó a través de la repetición de curvas de calibración para la identificación de las concentraciones mínimas detectables de histamina en la HPLC y luego se validó el método usando muestras cerebrales obtenidas a través de microdiálisis de la corteza prefrontal de ratas (**CPF**) sometidas a un modelo de dieta azucarada. Se demostró que el fosfato de sodio, el metanol y el OPA a una concentración de 2.5 mM son eficientes para la detección de histamina a concentraciones cerebrales. Además, se obtuvieron datos preliminares de que las ratas con dieta azucarada tienden a tener más histamina basal que las ratas de dieta normal en la CPF. Estos resultados aportan una técnica para la cuantificación de histamina y su estudio en estructuras del cerebro de ratas, el cual será de gran utilidad para la investigación de la neuroquímica de los procesos de conductas apetitivas, con rasgos adictivos, así como procesos cognitivos del aprendizaje y memoria.

SUMMARY

This work describes the background and implementation processes for assembling the ideal chromatographic conditions technique for histamine separations and this neurotransmitter detection. To this aim, we tried different mobile phase components and concentrations of O-phthalaldehyde (**OPA**) derivatizer to evaluate histamine content by high-performance liquid chromatography (**HPLC**) and fluorescence detection. Once the most suitable method was established, it was standardised through the repetition of calibration curves for the identification of the minimum detectable concentrations of histamine in the HPLC and then the method was validated using brain samples obtained through microdialysis of the prefrontal cortex of rats (**PFC**) subjected to a sugar diet model. Sodium phosphate, methanol, and OPA at a concentration of 2.5 mM were shown to be efficient for histamine detection at brain concentrations. In addition, we obtained preliminary data analysis showing that the PFC of rats on a sugar diet tend to have more basal histamine than rats on a control diet. These results allow us to propose a quantification technique for analyzing histamine and its study in rat brain structures. It will be beneficial for neurochemistry research of metabolic processes during appetitive behavior with addictive traits, as well as cognitive such as appetitive and aversive learning and memory.

Este trabajo lo dedico a mi madre Ma. Pompeya Ledezma Hernández quién me animaba cada día desde que entré a la licenciatura. A mi padre Eduardo Gutiérrez Montoya que confió en mí para darme su apoyo en toda índole durante mis años escolares. Y a mi novia Maricruz Díaz Fuentes por su apoyo, compañía y cariño desde que la conocí, un vínculo que nació fruto de mi gran aventura por las ciencias.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de forjarme en sus aulas y laboratorios.

A la Dra. Gabriela Vera por brindarme su orientación y enseñanza para el manejo del material de laboratorio y el apoyo técnico en la cromatografía. Agradezco por la luz que me brindó en todo mi camino durante la tesis y su función como cotutora de este trabajo.

A la Dra. María Isabel Miranda por hacer posible todas las oportunidades que tuvimos para estudiar, aprender, practicar e investigar. Una mujer con mucha fortaleza para el sostén del laboratorio.

Además:

A la Biol. Maricruz Reséndiz Flores por enseñarme sus conocimientos y sus habilidades sobre conducta, por compartirme su entusiasmo y por enseñarme la importancia del cuidado de los animales. Agradezco su compañía en los momentos más difíciles de la licenciatura. Una persona que percibo como un ejemplo a seguir en la investigación.

A Alejandro Rangel por su apoyo en el mantenimiento del laboratorio, a Jocelyne por sus enseñanzas en farmacología e histología, a Diana por ser mi compañera de aventuras en el laboratorio B14, a Imelda por compartirme sus consejos sobre la educación y el aprendizaje, a Leonor Casanova por su gran apoyo administrativo y al Dr. Gerardo Paredes por su dirección en la ENES, el cuál nunca dejó solos a sus estudiantes.

A mis profesores de la licenciatura, principalmente a la Dra. Mónica López, la Dra. Marie Bedos, la Dra. Magdalena Giordano, el Dr. Gerardo Paredes, el Dr. Oswaldo Pérez, la Dra. Isabel Méndez, la Dra. Guadalupe García y el Dr. Javier Sánchez.

A la Dra. Verónica Rodríguez Córdova, la Dra. Marisol De la Mora Curiel, al Dr. Jorge Humberto Limón Pacheco y la Dra. Marie Christine Aline Bedos que amablemente me dieron sus observaciones sobre la tesis.

A mis amigos y compañeros de mi generación Laura, Marina, Armando, Karen, Diana, Daniela, Stacy, Ana, Andrea, Paula y Triana que me hicieron vivir la licenciatura con gran alegría. Para finalizar, a mis hermanos Bladimir y Fermín por las pláticas y compañías sobre la ciencia que me motivaban a continuar.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IN201420 e IN209122.

ÍNDICE

RESUMEN II
SUMMARY III
AGRADECIMIENTOS V
ÍNDICE VII
1. INTRODUCCIÓN 1
1.1. Cromatografía 1
1.1.1. Historia 2
1.1.2. Tipos de cromatografía 2
1.1.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 5
1.2. Histamina 10
1.2.1. Propiedades moleculares 10
1.2.2. Síntesis y metabolismo 10
1.2.3. Receptores y funciones en el sistema nervioso 12
2. ANTECEDENTES 15
2.1. Detección de histamina por HPLC 15
2.2. Longitud de onda de emisión y excitación para la detección de histamina por HPLC-FL 20
2.3. Fase móvil para la detección de histamina por HPLC-FL 22
2.4. Derivatizantes para la detección de histamina por HPLC-FL 23
2.5. Áreas cerebrales con presencia de histamina analizada por HPLC-FL 27
2.6. Histamina y su relación con el azúcar 29
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 30
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN 30
5. HIPÓTESIS 31
6. OBJETIVO 31
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 31
8. JUSTIFICACIÓN 32
9. MATERIALES Y MÉTODOS 32
9.1. Equipo 32
9.2. Materiales 33
9.3. Reactivos 33
9.4. Diseño experimental 34
9.4.1. Montaje 34
9.4.2. Estandarización 36
9.4.3. Validación 36
9.5. Integración y análisis estadístico 36
10. RESULTADOS 36
10.1. El amortiguador de fosfato de sodio en la fase móvil es eficiente para la detección de histamina. 36
10.2. El metanol es un eluyente polar eficiente para la detección de histamina 40

10.3. El derivatizante OPA/NAC a 2.5 mM es una opción eficiente para la detección de histamina 41
10.4. La detección mínima de histamina se probó en el rango de picomolar 43
10.5. Validación del método con la cuantificación de histamina en ratas con dieta azucarada y las ratas con dieta normal 47
11. DISCUSIÓN 49
11.1. Montaje 49
11.2. Estandarización 51
11.3. Validación 51
12. CONCLUSIONES 53
13. REFERENCIAS 54

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cromatografía

La cromatografía es un método de separación física de sustancias (Freifelder, 1981). Una muestra se disuelve en un fluido denominado fase móvil, que la transporta a través de un sistema en el cual se fija un material denominado fase estacionaria. Dado que las diferentes sustancias de la muestra suelen tener diferentes afinidades por la fase estacionaria, cada sustancia se va reteniendo en menor o mayor medida en función de dicha afinidad. De esta manera, los componentes (también llamados solutos o analitos) se desplazan a diferentes velocidades en el fluido móvil, lo que provoca su separación (Figura 1). Actualmente existen equipos llamados cromatógrafos que son de alta tecnología para realizar cromatografía (Colin F. Poole, 2003; Roca Salom et al., 2003).

Cabe decir que la cromatografía puede ser preparatoria o analítica. El objetivo de la cromatografía preparatoria es separar los componentes de una mezcla, mientras que la cromatografía analítica sirve para cuantificar los componentes en una mezcla. Los dos tipos no se excluyen mutuamente (Colin F. Poole, 2003).

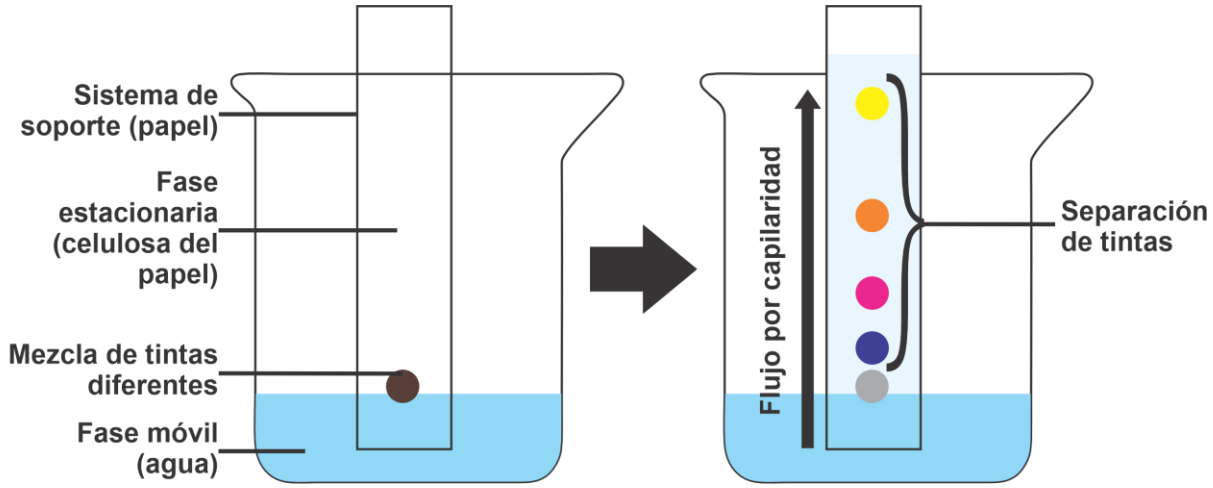


Figura 1. Funcionamiento elemental de la cromatografía. Una mezcla de tintas de colores diferentes puede ser separada a través de la cromatografía en papel utilizando la capilaridad del agua como un mecanismo de flujo que desplace las moléculas de cada color de tinta a lo largo del papel.

1.1.1. Historia

Los primeros experimentos de la cromatografía se pueden rastrear desde finales del siglo XIX. Existen diferencias en los primeros autores que realizaron los experimentos de cromatografía. Entre los más antiguos precursores se encuentra Carl Runge que a mediados del siglo XIX realizó técnicas de separación parecidas a la cromatografía usando papel. Otro más reconocido es David Day, que a finales del mismo siglo realizó separaciones de petróleo usando un sistema parecido a la columna actual. También se reporta a Mijail. S. Tswett en el año de 1906; quien probó la separación de pigmentos vegetales utilizando una columna de carbonato de calcio y usando solventes como un medio de transporte (Colin F. Poole, 2003).

Propiamente la invención de las técnicas cromatográficas como las conocemos actualmente sucedió a mediados del siglo XX. Archer John Porter Martin (Archer J. P. M.) y John Synge, fueron galardonados con el Premio Nobel en 1952 por sus aportaciones sobre la cromatografía de partición. Además, Archer J. P. M. también colaboró con Anthony T. James para el perfeccionamiento de la cromatografía de gas (Freifelder, 1981; Colin F. Poole, 2003).

Posteriormente en la década de 1960 se perfeccionaron las técnicas para la cromatografía líquida a cargo de Csaba Horvath y Josef Huber cada quién por su lado. Ellos perfeccionaron reduciendo exitosamente el tamaño de poro en las columnas, mejoraron la velocidad y la presión del flujo. A finales de dicha década, empezaron a salir comercialmente los primeros equipos para cromatografía líquida (Cromatografía Líquida de Alta Resolución; **HPLC**) a cargo de las compañías Walters Associates y DuPont (Majors, 2015; Snyder & Kirkland, 1974).

1.1.2. Tipos de cromatografía

Los métodos en cromatografía se pueden clasificar según 3 criterios principales: por la naturaleza de sus fases, por el mecanismo de la separación de sustancias y por el sistema en el que se aloja la fase estacionaria. Los métodos no son excluyentes, si no que pueden combinarse. A continuación, se describen las tres clasificaciones.

1.1.2.1. Por la naturaleza de su fase

Esta clasificación se diferencia por el estado de la materia de cada fase móvil (Figura 2) (C.F. Poole, 2000). Se destacan los siguientes:

- Cromatografía de gas: en la cual, la fase móvil es un fluido gaseoso, mientras que la fase estacionaria puede ser igualmente gaseosa o líquida.
- Cromatografía de líquidos: en la cual, la fase móvil es líquida mientras que la fase estacionaria puede ser igualmente líquida, sólida o una agrupación de micelas.
- Cromatografía de fluidos supercríticos: en la cual, la fase móvil es un fluido supercrítico, es decir se difunde como un gas, pero disuelve sustancias como un líquido. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido.

1.1.2.2. Por el mecanismo de separación de las sustancias

Existen al menos 4 mecanismos fisicoquímicos que permiten separar sustancias en cromatografía (Coskun, 2016; Freifelder, 1981; Colin F. Poole, 2003):

- Cromatografía de adsorción: Los solutos de la fase móvil se retienen en las superficies de la fase estacionaria según su capacidad de adsorción.
- Cromatografía de partición o reparto: Los solutos de la fase móvil se retienen en la fase estacionaria según las características de solubilidad.
- Cromatografía de intercambio iónico: separa las sustancias con base en la carga eléctrica de las moléculas componentes.
- Cromatografía de exclusión/por tamaño molecular: separa las moléculas con base en el tamaño de las moléculas componentes de una mezcla.
- Cromatografía por afinidad: separa las moléculas a partir de afinidades moleculares específicas entre la fase móvil y la fase estacionaria. Por ejemplo, antígenos y anticuerpos, enzimas y sustratos o receptores y ligandos, por lo que es utilizada principalmente para separar macromoléculas biológicas.
- Cromatografía de fase ligada: en la cual se separan los solutos combinando la separación por adsorción y por partición.

1.1.2.3. Por el sistema en el que se aloja la fase estacionaria

Hay dos principales tipos de soporte en cromatografía (Coskun, 2016; Majors, 2015):

- Cromatografía plana:
  - Cromatografía en papel: Se utiliza papel simple como sistema de soporte dónde sucede la separación. La fase móvil sólo puede ser líquida y el movimiento de la mezcla a separar se produce por fuerzas de la capilaridad o de la gravedad.
  - Cromatografía en capa fina: Se utilizan placas planas sólidas con materiales pulverizados en su interior que sirven como fase estacionaria. Las placas planas sólidas pueden ser de vidrio y el material interno puede ser gel de sílice, alúmina o celulosa.
- Cromatografía en columna:
  Se utiliza un tubo estrecho que se rellena con la fase estacionaria. Este tubo constituye la columna por donde fluirá la fase móvil.

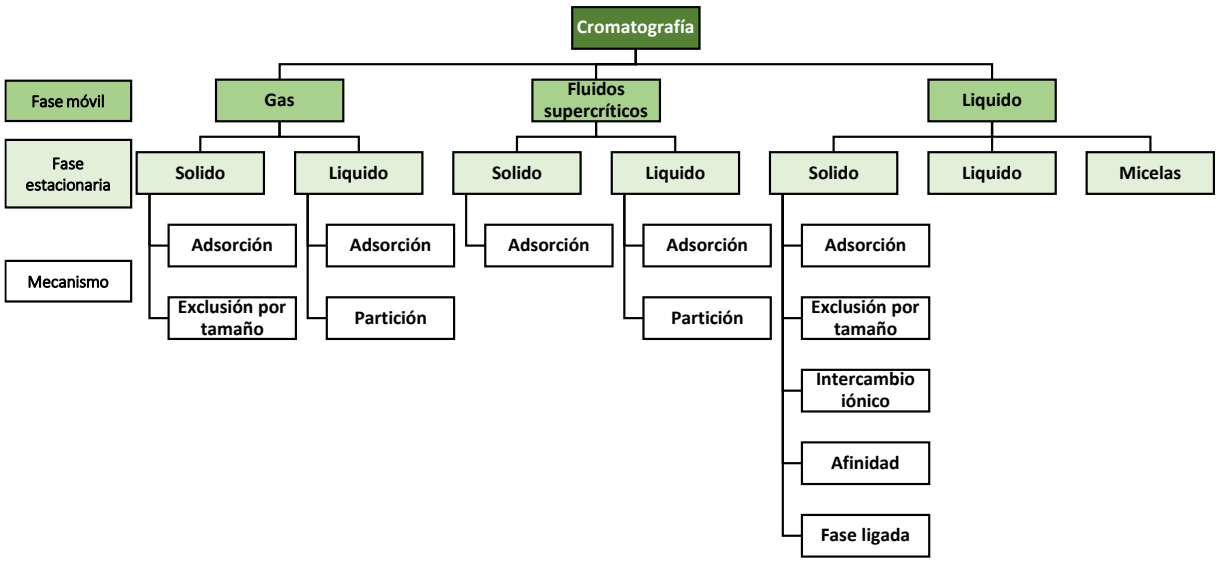


Figura 2. Clasificación de la cromatografía según la naturaleza de su fase móvil. La fase móvil de la cromatografía puede ser de gas, fluidos supercríticos y líquida. Cada fase móvil puede combinarse con diversas fases estacionarias o con diferentes mecanismos de separación de solutos (Modificado de Poole, C. F., 2000).

1.1.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución es un tipo de cromatografía en columna que utiliza un líquido como fase móvil (Snyder & Kirkland, 1974). Es una técnica frecuentemente utilizada en bioquímica y química analítica. Se abrevia HPLC por las siglas en inglés de High-performance liquid chromatography. La HPLC separa los componentes de una mezcla según las interacciones fisicoquímicas entre la fase móvil y la fase estacionaria dentro de la columna cromatográfica (Yuri V. Kazakevich, 2007). La HPLC combina tres principios para la separación de sustancias: la polaridad, la carga eléctrica y el tamaño molecular (Roca Salom et al., 2003).

Tradicionalmente se empleaban columnas con fase estacionaria de carácter polar, mientras que la fase móvil era de carácter apolar. Esta técnica se llama HPLC de fase normal. Sin embargo, posteriormente se invirtió la característica, pues para las columnas se usaron materiales apolares mientras que la fase móvil se volvió de carácter polar. Esta técnica se llamó HPLC de fase reversa y es la más utilizada hoy en día por su alta replicabilidad y aplicabilidad (Wellings, 2005).

En general, la HPLC se basa en los principios de la cromatografía general, pero a un nivel más sofisticado, ya que además se automatiza el proceso y se integra un detector de la señal que se conecta a una computadora para su análisis. Cabe resaltar que, a principios del año 2000, salieron al mercado los primeros equipos de Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (**UHPLC**). Esta modalidad de la HPLC tiene una mayor sensibilidad y reducción de ruido, lo cual mejora la detección y cuantificación de moléculas (Gika et al., 2015).

1.1.3.1. Módulos funcionales básicos de la HPLC

La HPLC consiste en una serie de mangueras por donde fluye la fase móvil, sin embargo, conforme avanza pasa por diferentes módulos con funciones específicas, los cuáles son descritos a continuación (Figura 3).

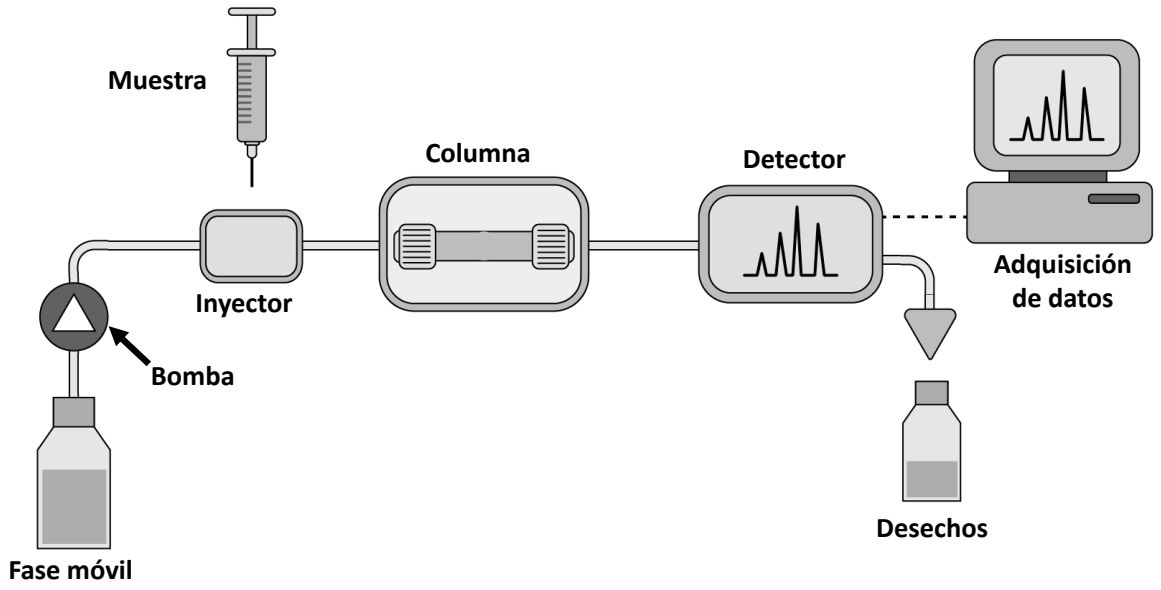


Figura 3. Esquema general de los componentes de la HPLC. La HPLC inicia con la toma de líquido de un reservorio de fase móvil, el cuál por lo general contiene dos componentes: un amortiguador para mantener el pH de una muestra y evitar que se degraden lo solutos; y un solvente que se combina con el amortiguador para producir la separación de los solutos de una muestra. Luego el equipo cuenta con un flujo generado por una bomba regulada que mantiene un flujo continuo. Posteriormente, existe un sitio de inyección de una muestra de interés para su separación a partir del cual se mezclará la muestra con la fase móvil. A continuación, el flujo llevará la muestra a través de una columna dónde sucederá la separación de sustancias para que posteriormente un detector pueda enviar los datos a una computadora para su codificación (Modificada de Sensirion corporation official website).

1.1.3.1.1. Bomba

La bomba es un instrumento que ejerce presión sobre los líquidos de la HPLC para formar un flujo de la fase móvil de la HPLC. Este componente es muy importante porque brinda la fuerza para la movilidad de las partículas. Los equipos más actuales pueden contar con más de una bomba, lo cual permite combinar un líquido diferente por cada bomba (Verma & Santoyo, 2007).

1.1.3.1.2. Inyector

Este módulo se encarga de inyectar las soluciones que contienen las muestras de interés para analizar por HPLC. Se encuentra antes de la columna y los equipos más actualizados tienen un inyector completamente automatizado (Verma & Santoyo, 2007)

1.1.3.1.3. Columna

La columna es una pieza larga y delgada en forma de tubo con el interior poroso para que el flujo líquido vaya separando las sustancias conforme avanza en su interior. Existen columnas de diferentes tipos clasificadas por longitud, por tamaño de poro o por material componente en su interior. La mayoría de las columnas para fase reversa se compone de octadecilsilano (**C18**) unido químicamente a una sílice porosa o micropartículas de cerámica, lo cual le proporciona un carácter apolar a la fase estacionaria (Majors, 2015; Verma & Santoyo, 2007)

1.1.3.1.4. Detector

Una vez que el flujo ha pasado por la columna, las sustancias de la muestra se han separado, por lo cual pasan en tiempos distintos por un detector que registra la señal emitida por las sustancias separadas. La cantidad de la señal es distinta en la medida en que sea la concentración de la sustancia. La detección se realiza a partir de características fisicoquímicas de las sustancias por ejemplo por la absorbancia de luz ultravioleta (**UV**) o de luz infrarroja; también según el grado de emisión de FL, por reacción electroquímica generada por la sustancia, etc. (Tabla 1) (Brinkman, 1987).

En particular, el detector de FL es de destacar por su alta sensibilidad cuando se trata de concentraciones mínimas de una sustancia en la HPLC. Este detector funciona a partir de la señal de luz que recibe de una sustancia (emisión) que es previamente excitada con luz de otra longitud de onda (excitación) (Swartz, 2010).

Cabe decir que una sustancia puede emitir FL de manera natural bajo ciertas frecuencias de longitud de onda, pero también existen aquellas sustancias que no emiten FL. Para lo anterior, se realiza un proceso de derivatización en el cual se busca acoplar una molécula no fluorescente con una que sí lo es, de tal manera que el detector registre su señal y por ende la presencia de la molécula de interés (Locatelli et al., 2012).

Tabla 1. Comparación de distintos detectores para HPLC sobre sus rangos de detección.

Método de detección	*Límites de detección*	*Notas sobre el método*
Absorción UV	1 pg-1 ng	Relativamente sensible No selectivo
FL	10 fg-10 pg	Sensible Detección natural o con derivatización Selectivo
Índice de refracción	10 ng- 1 µg	Relativamente sensible No selectivo
Electroquímico	100 fg-1 ng	Sensible Detección universal Selectivo
Transformada de Fourier con infrarrojo	100 ng-1 µg	Relativamente sensible
Espectrometría de masas	100 ag-1 ng	Sensible Selectivo

Nota: El detector de absorción UV, el de FL y el de espectrometría de masas son los que mayor sensibilidad tienen para la detección de sustancias (Modificada de Locatelli et al., 2012).

1.1.3.2. Cromatograma

El cromatograma es el gráfico resultante del registro de la señal recibida por el detector de la HPLC. Los cromatogramas constan de un eje X que representa el tiempo transcurrido y de un eje Y que representa la intensidad de la señal detectada de las sustancias contenidas en el flujo (Figura 4) (Colin F. Poole, 2003).

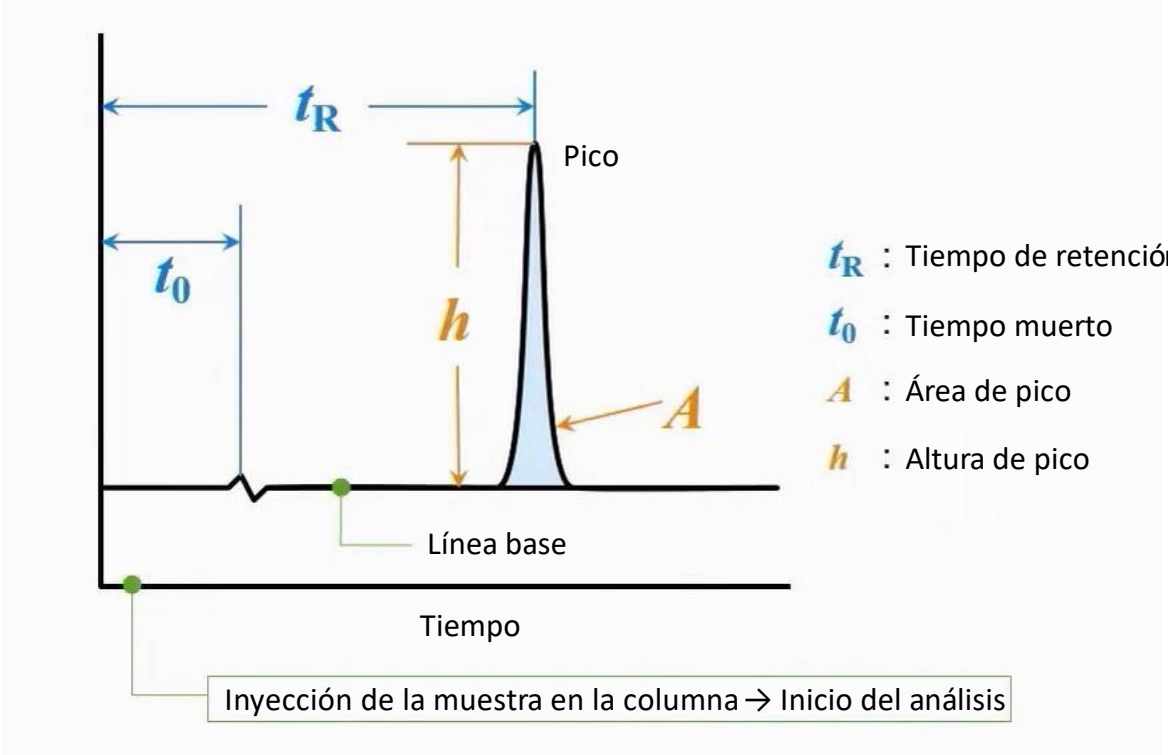


Figura 4. Componentes del cromatograma. Un pico es una señal correspondiente a un soluto de interés detectada por el equipo de la HPLC. El tiempo de retención es el lapso desde que se inyectó una muestra hasta el pico de un soluto de interés alcanza su máxima altura. El tiempo muerto es el lapso desde que se inyectó la muestra hasta que aparecen los primeros solutos detectables. El área del pico es el área bajo la curva del pico de un soluto. La altura del pico indica la intensidad máxima que alcanzó un soluto en la señal del detector. La línea base corresponde a la señal estable del flujo de la base móvil (Modificada de What Is HPLC (High Performance Liquid Chromatography): SHIMADZU (Shimadzu Corporation), n.d.).

Cuando se separan las sustancias en la HPLC, lo solutos pasan por el detector en diferentes momentos del flujo, los cuáles se registrarán en el cromatograma en forma de picos. En una separación y detección adecuada, la señal es proporcional a la concentración del analito correspondiente separado, obteniéndose a partir del área bajo la curva de un pico en el cromatograma (Colin F. Poole, 2003; Snyder & Kirkland, 1974; Yuri V. Kazakevich, 2007).

1.2. Histamina

La histamina es una sustancia de gran relevancia en el ámbito clínico por sus implicaciones en la mediación de respuestas inmunes (Maintz & Novak, 2007), en la conducta (Arrigoni & Fuller, 2021) e incluso en la industria alimentaria como un marcador de toxicidad en los alimentos (Moitessier et al., 2020).

1.2.1. Propiedades moleculares

La histamina es una de las más importantes aminas biogénicas por sus acciones moduladoras, al menos en los organismos mamíferos. Molecularmente es una amina compuesta de un anillo de imidazol y de una cadena de etilamina, por ello, a la histamina también se le llama 2-[4-imidazol]-etilamina (Figura 5). Cabe destacar que es una molécula polar con fórmula química $C_5H_9N_3$ y su peso molecular es 111.15 g/mol, por lo que podemos considerar que es de bajo peso molecular como todas las aminas biogénicas (*Histamine | C5H9N3 - PubChem*, n.d.; Perdan-Pirkmajer et al., 2010).

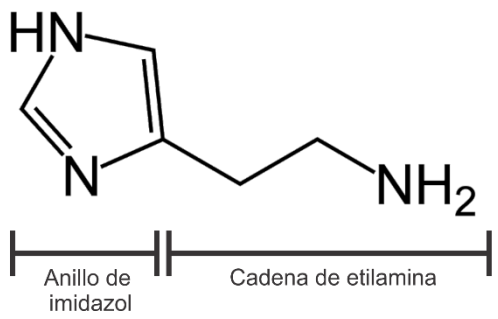


Figura 5. Estructura molecular genérica de la histamina. El anillo de imidazol contiene dos nitrógenos mientras que la cadena de etilamina contiene un grupo amino.

Dependiendo de las condiciones del entorno, la histamina puede tomar diversas formas moleculares: especies ácidas y básicas, tautoméricas e isoméricas (Kodchakorn et al., 2019).

1.2.2. Síntesis y metabolismo

La histamina se produce en diversos tejidos animales; en particular, en el tejido nervioso su producción se concentra en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo en el cerebro. A partir de ahí, se proyectan vías neuronales para la liberación de histamina a otras áreas del sistema nervioso (Figura 6) (Arrigoni & Fuller, 2021).

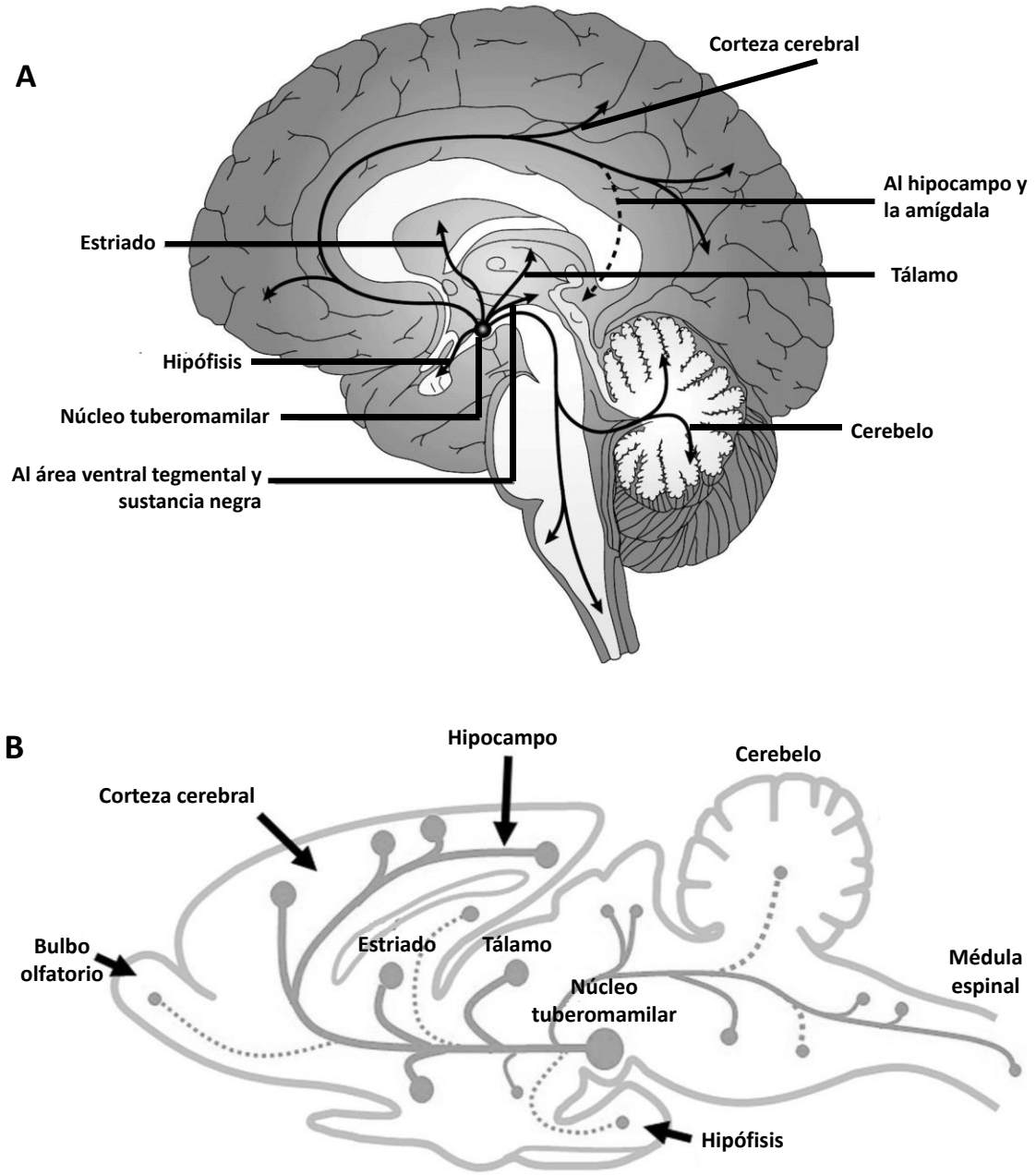


Figura 6. Sistema histaminérgico en el cerebro. Las áreas de proyección son similares entre humanos (A) y ratas (B) (Modificado de Haas et al., 2008 y Nieto-Alamilla et al., 2016).

Las aminas biogénicas se caracterizan por ser sintetizadas a partir de la descarboxilación enzimática de aminoácidos; tal es el caso de la histamina, que se sintetiza a partir de la histidina, gracias a la histidina descarboxilasa (**HDC**). Una vez que la histamina ejerce su

acción, se puede metabolizar por desaminación oxidativa extracelular del grupo amino por la diamino oxidasa (**DAO**) o por metilación intracelular del anillo de imidazol por la histamina-N-metiltransferasa (**HNMT**) (Maintz & Novak, 2007). En el cerebro de los mamíferos, la HNMT es la responsable del catabolismo de la histamina en las neuronas y células gliales, pues la expresión de DAO en el cerebro es poca o nula (Figura 7) (Yoshikawa et al., 2019).

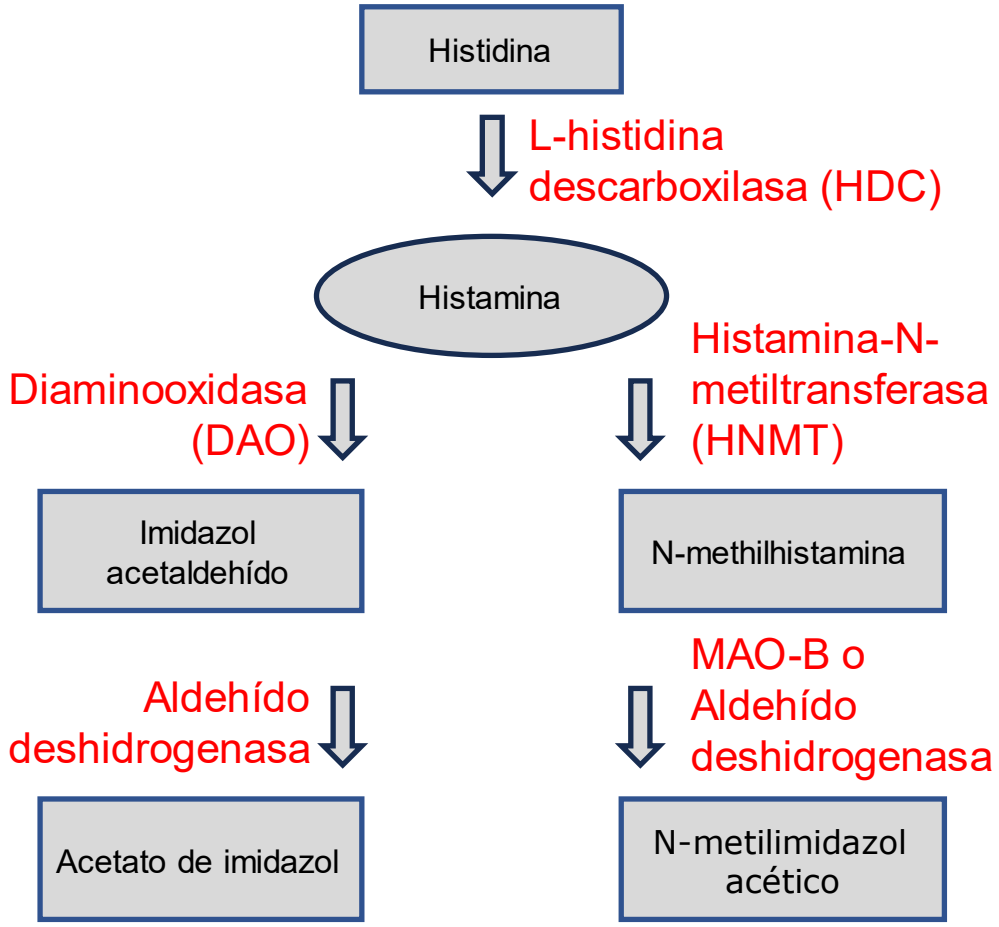


Figura 7. Metabolismo de la histamina (modificada de Maintz & Novak, 2007).

1.2.3. Receptores y funciones en el sistema nervioso

Existen 4 receptores para la histamina distribuidos en el cuerpo humano: H1, H2, H3 y H4 (Figura 8). Los 4 receptores son metabotrópicos y se encuentran tanto en el cerebro como en la periferia, aunque el H3 casi exclusivamente en el cerebro y el H4 casi

exclusivamente en la periferia. Al ser receptores metabotrópicos, están acoplados a proteínas G, las cuáles varían según el tipo de receptor.

El receptor H1 está acoplado a la vía intracelular de la proteína Gq. Esta vía incrementa la fosforilación de proteínas a través de la actividad de la proteína quinasa C y activa la liberación de Ca^{2+} intracelular a través de la actividad del inositol trifosfato (Levick, 2021). En el cerebro, los receptores H1 se expresan en gran medida en la corteza, los grupos celulares colinérgicos del tegmento mesopontino, el locus cerúleo, los núcleos del rafe, el hipotálamo y el sistema límbico, incluidos los núcleos septales, la amígdala y el hipocampo. Generalmente tienen respuestas neuronales excitatorias y son el blanco de muchos antihistamínicos (Arrigoni & Fuller, 2021).

El receptor H2 también tiene respuestas neuronales excitatorias, a través de las proteínas Gs. Esta vía incrementa la fosforilación de proteínas a través de la actividad de la proteína quinasa A (Levick, 2021). Se han detectado alta densidad de receptores H2 en los ganglios basales, hipocampo, amígdala y corteza. Específicamente los H2 de la corteza están involucrados en la promoción de funciones cognitivas y potenciación a largo plazo (Nomura et al., 2019), mientras que en otras regiones cerebrales afectan la percepción del dolor (Hasanein, 2011).

El receptor H3 está acoplado al complejo Gi/o. Esta vía inhibe los canales de K^+, los canales de Ca^{2+} y el transportador de Na^+/H^+ a través de los metabolitos del ácido araquidónico (AA), también disminuye la fosforilación de proteínas debido a que inhibe el adenilato ciclasa (Levick, 2021). Se encuentra casi exclusivamente en el cerebro y a diferencia de los anteriores, tiene una respuesta inhibitoria por sus efectos sobre canales iónicos que cambian el voltaje de la membrana. Es muy abundante su presencia en las capas profundas de la corteza cerebral, hipocampo, estriado, tálamo, hipotálamo y tronco encefálico. En la neurona, los H3 se encuentran distribuidos a lo largo de toda su extensión en cuerpos celulares, dendritas y axones (Arrigoni & Fuller, 2021). En las neuronas del núcleo tuberomamilar, los H3 funcionan como autoreceptores que proporcionan una retroalimentación negativa para restringir la síntesis y liberación de histamina. También funcionan como heteroreceptores presinápticos en otras áreas del cerebro. Estos heteroreceptores presinápticos H3 inhiben la liberación de varios

neurotransmisores, incluidos glutamato, acetilcolina, serotonina, noradrenalina y dopamina (Haas et al., 2008).

El receptor H4 es el más recientemente descubierto y también se acopla al complejo Gi/o como H3. Se expresa predominantemente en las células hematopoyéticas y se sugiere que juega un papel en la inflamación y las alergias. Si bien han habido experimentos que mostraron la presencia de H4 en capas profundas de la corteza, en el tálamo y el hipocampo tanto de humano como de ratón (Connelly et al., 2009), no existe un consenso general de dicha afirmación, limitando su estudio a la periferia del sistema nervioso.

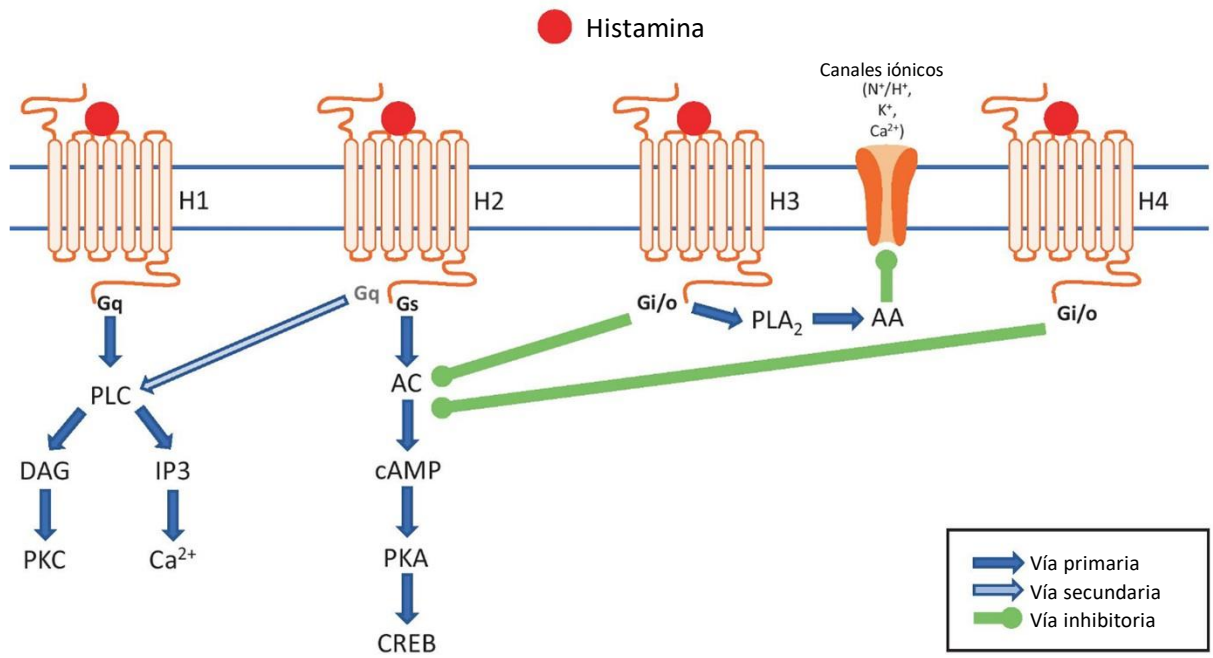


Figura 8. Cascadas clásicas de señalización de los receptores de histamina: H1, H2, H3 y H4. PLC, fosfolipasa C; DAG, diacilglicérido; PKC, proteína cinasa C; IP3, inositol trifosfato; Ca^{+2}, ion de calcio; AC, adenilato ciclasa; cAMP, adenosín monofosfato cíclico; PKA, proteína cinasa A; CREB, proteína elemento de respuesta al AMPc; PLA_2, fosfolipasa A2; AA, ácido araquidónico. (Modificada de Levick, 2021).

2. ANTECEDENTES

2.1. Detección de histamina por HPLC

El estudio de la histamina a través de la HPLC tiene sus orígenes en los años 50´s con los análisis cromatográficos de mezclas de aminoácidos utilizando una derivatización con OPA. Como ejemplo, un estudio de 1971 reportó la cuantificación de histamina en conjunto con histidina, serina, tirosina, etc., utilizando una mezcla de OPA con mercaptoetanol (**ME**) (Roth, 1971).

Cabe recordar que ciertas sustancias de interés necesitan procesarse para ser detectadas por HPLC, es decir derivatizarse: la histamina es un ejemplo. Este proceso consiste en combinar la histamina con otra molécula que sí pueda ser detectada. El OPA es un agente que produce FL y que permite derivatizar la histamina ya que se enlaza químicamente con el OPA.

También se han reportado otros métodos de detección de histamina con HPLC, utilizando un detector electroquímico en conjunto con OPA y ME, al igual que en los estudios tradicionales con detector de FL. Estos análisis reflejaron que se podían alcanzar resultados similares de detección

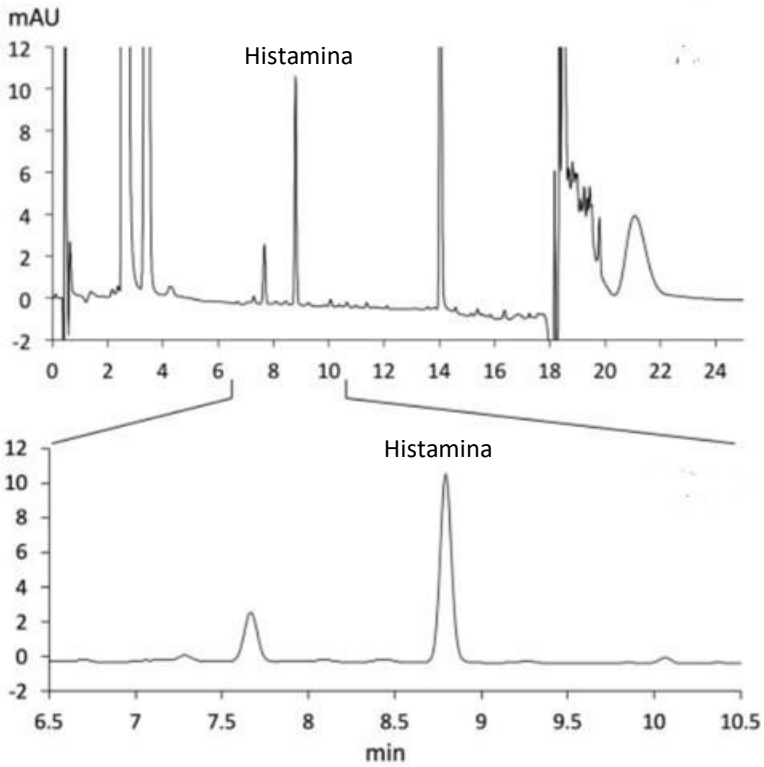


Figura 9. Cromatograma de la detección de histamina contenida en muestras de histaglobina. Se observa que la histamina es efectivamente detectada con detector de UV en el minuto 8.8. mAU: milli-absorbance unit (Modificada de Tanio et al., 2020).

comparados a los del detector de FL (Jensen & Marley, 1995).

Cabe resaltar que el uso de OPA se continúa utilizando como derivatizante en la actualidad e incluso explorando su uso con nuevos detectores, por ejemplo en detector de UV para el análisis de histamina validada con muestras farmacéuticas de histaglobina® (Figura 9) (Tanio et al., 2020).

Sin embargo, a pesar de los diferentes detectores en los que se han validado métodos para histamina (Tabla 2), se destaca la detección por FL ya que la señal se recibe en un sistema cerrado de luz para evitar interferencias del exterior; a diferencia de la detección electroquímica que es susceptible a alteraciones electroquímicas del ambiente y del aparato mismo de la HPLC (Swartz, 2010). Además, respecto al detector de UV, el de FL tiene una mayor sensibilidad (Swartz, 2010).

Tabla 2. Comparación de distintos detectores para HPLC sobre sus rangos de detección.

Columna de separación	*Condiciones de derivatización y detección*	*Fase móvil y aditivos*	*Muestra*	*Límite de detecció n*	*Fuente*
Columna microperforad a (gel de sílice C18)	FLD (PSE precolumna) 3 M PSE/3 M K_2CO_3 y ACN 100 ◦C durante 90 min	75% ACN en agua	Cerebro de rata	0,015 pM mL^{-1}	(Takashi Yoshitake, Yamaguchi, et al., 2003)
Columna HILIC Core-Shell para HPLC (UPLC)	ESI-MS/MS	0,2% ácido fórmico/20 mM formiato de amonio en agua/100% ACN	LCR de rata	-	(Zhang et al., 2011)

Columna de separación	*Condiciones de derivatización y detección*	*Fase móvil y aditivos*	*Muestra*	*Límite de detecció n*	*Fuente*
Columna de intercambio catiónico (TSK gel SP-2SW)	FLD (OPA post-columna) OPA al 1% en metanol, 45 ◦C, pH 12,5	0.25 M KH_2PO_4/0.5 M KH_2PO_4	LCR humano	-	(Kiviranta et al., 1995)
Columna de separación de fase Inversa (SC-5ODS)	FLD (OPA poscolumna). 2.5 M NaOH/0.05% OPA/ 2 M H_3PO_4, 42 ◦C	5% metanol en 0.16 M KH_2PO_4/ 0.8 mM SOS	LCR humano	0.09 pM mL^{-1}	(Kanbayashi et al., 2009; Zeitzer et al., 2012)
Columna de intercambio catiónico (gel TSK SP-2SW)	FLD (OPA post-columna) 1% OPA/2 M NaOH/ 10% H_2SO_4, 45 ◦C, pH 12	0.125 M KH_2PO_4	LCR humano	0.09 pM mL^{-1}	(Nishino et al., 2009)
Columna de intercambio catiónico (gel TSK SP-2SW)	FLD (OPA post-columna) 45 ◦C, pH 12.5	0.25 M KH_2PO_4	LCR de rata	-	(Soya et al., 2007)
Columna Acquity UPLC BEH C18	ESI-MS/MS (precolumna 4-BBS) 2.5 M 4-BBS en ACN/0.1 M TEA 45 ◦C durante 10 min	0,1% de ácido fórmico en ACN/agua/0,1 % ácido fórmico en CAN	LCR humano	0.0125 pM mL^{-1}	(Croyal et al., 2010; Dauvilliers et al., 2012)
Columna Atlantis HILIC	ESI-MS/MS (precolumna propiónico anhídrido) 50 M de propiónico anhídrido en ACN, 4 ◦C durante 2 h.	ACN/20 mM Acuoso formiato de amonio	Cerebro de rata	<0.75 pM mL^{-1}	(Bourgogne et al., 2012)

Columna de separación	*Condiciones de derivatización y detección*	*Fase móvil y aditivos*	*Muestra*	*Límite de detecció n*	*Fuente*
Separación por pares iónicos en fase inversa columna (5ODS-H)	FLD (OPA post-columna) 1% OPA/2.5 M NaOH/ 4 M H_3PO_4, 50 ◦C	0.16 M KH_2PO_4/0.1 mM SOS	Cerebro de rata	0.045 pM mL^{-1}	(Itoh et al., 1992)
Fase inversa CAPCELL PAK MG Columna C_{18}	FLD (post-column OPA) 0.05% OPA/2% 2-ME/ 0.5 M NaOH, 42 ◦C	Metanol/0.16 M KH_2PO_4/ 200 mg L^{-1} SOS	Cerebro de rata y ratón	1.44 pM mL^{-1}	(Miyamoto et al., 2004)
Paso estrecho de fase invertida columna (Mightysil RP-18)	FLD (OPA post-columna) 1% OPA/THF, 25 ◦C	0.05 M amortiguador de acetato/ 0.01 M SOS/ACN	Plasma	0.25 pM mL^{-1}	(Kuruma & Sakano, 1999)
Columna C18 Ultrasphere	FLD (OPA pre-columna) 10 mg mL^{-1} OPA en metanol/1 M NaOH (4 min)/ 3 M HCl (20 min), 25 ◦C	50 mM amortiguador de acetato / Metanol/ACN/ 8 mM decanosulfonato de sodio	Sangre humana	18 pM mL^{-1}	(Previati et al., 2002)
Columna de intercambio catiónico (TSK gel SP-2SW)	FLD (OPA post-columna) 1% OPA en metanol, 45 ◦C, pH 12.5	0.25 M KH_2PO_4/0.5 M KH_2PO_4	Sangre humana y cerebro de ratón	0.5 pM mL^{-1}	(Yamatodani et al., 1985)

Columna de separación	*Condiciones de derivatización y detección*	*Fase móvil y aditivos*	*Muestra*	*Límite de detecció n*	*Fuente*
Columna LC C18 de fase inversa (Cosmosil 5C18 PAQ)	ESI-MS/MS	Metanol/0,005 % TFA	Basófilo humano línea celular	2.7 pM mL^{-1}	(Koyama et al., 2009)
Columna analítica de fase inversa (TSK-gel ODS 80Ts)	ECD (OPA pre-columna) 0.2 M OPA en metanol/1 M Na_2SO_3/ 0.1 M amortiguador borato de sodio, 25 ◦C	30% metanol en 50 mM K_2CO_3/ 0.5 mM Na_2EDTA	Cerebro, piel y estómago	1.25 pM mL^{-1}	(Maldonado & Maeyama, 2013a)
Wakosil II de fase inversa 5C18 -100	FLD (PSE pre-columna) 0.5 M PSE en ACN/0.5 M K_2CO_3 en agua, 100 ◦C por 90 min	ACN/agua/0.03% TEA	Orina humana	0.017 pM mL^{-1}	(Takashi Yoshitake, Ichinose, et al., 2003)
Columna Agilent Zorbax Eclipse XDB- C18 (UPLC)	FLD (PSE pre-columna) 2.5 M PSE/1 M K_2CO_3 60 ◦C por 30 min	CAN/agua/ácido acético	Orina humana	0.04 pM mL^{-1}	(Hogan et al., 2012)
Columna Acquity UPLC BEH C18	ESI-MS/MS (4-BBS pre-columna) 2.5 M 4-BBS en ACN, 25 ◦C por 60 min	ACN en agua/0.1% ácido fórmico	LCR humano	0.01 pM mL^{-1}	(Bassetti et al., 2010)

Columna de separación	*Condiciones de derivatización y detección*	*Fase móvil y aditivos*	*Muestra*	*Límite de detecció n*	*Fuente*
Columna de fase inversa Phase-II ODS de Bioanalytical Systems	ECD (OPA pre-columna) OPA/ME/THF/0.4 M H_3PO_3/ 1 M NaOH	Na_2HPO_4/0.1 M NaH_2PO_4/ 1.0 mM Na_2EDTA/0.4 % TEA/ 16% metanol/14% ACN	Mastocitos peritoneales de rata	<2 pM mL^{-1}	(Jensen & Marley, 1995)
Columna Acquity UPLC BEH C18	ESI-TOF-MS	20 mM $HCOONH_4$/ACN	Pelo de ratón	< 40 pM mL^{-1}	(Kawanishi et al., 2006, 2007)
Columna de intercambio catiónico (TSK gel SP-2SW)	FLD (OPA post-columna) 1% OPA en metanol, 45 ◦C, pH 12.5	0.25 M KH_2PO_4/0.5 M KH_2PO_4	Cerebro humano	7 pM g^{-1}	(Rinne et al., 2002)

Notas: 4-BBS, cloruro de 4-bromobencenosulfonilo; CAN, acetonitrilo; LCR, líquido cefalorraquídeo; ECD, detección electroquímica; ESI, ionización por pulverización de electrones; GC, cromatografía de gases; HILIC, cromatografía de interacción hidrofílica; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; LC, cromatografía líquida; ME: 2-mercaptoetanol; MS: espectrometría de masas; OPA: o-ftalaldehído; PSE: éster N-hidroxisuccinimídico del ácido 4(1-pireno)butírico; SOS: sulfonato de octano; TEA: trietilamina; TFA: trifluoroacético; THF: tetrahidrofurano; TOF: tiempo de fluorescencia; UPLC: cromatografía líquida de ultra alta resolución; -: sin datos. (Wang et al., 2013).

2.2. Longitud de onda de emisión y excitación para la detección de histamina por HPLC-FL

Cabe agregar que no sólo el detector de la HPLC y el derivatizante es relevante para la detección, sino también la longitud de onda cuándo se trata de la HPLC-FL, pues sólo en

las longitudes de onda correctas de excitación y emisión serán detectados los analitos de interés, en este caso histamina.

Las longitudes de onda son muy consistentes entre los estudios, aproximadamente excitación de 345 nm y emisión de 445 nm. Por ejemplo, existe la validación de un método con muestras de atún enlatado para la determinación de histamina con OPA como derivatizante utilizando de excitación 345 nm y de emisión 445 nm (Peng et al., 2008).

Otro ejemplo es el equipo de Miyamoto que desarrolló un método para el análisis simultáneo de los niveles de histamina en cerebro de ratón y rata. Las muestras fueron extraídas por medio de una extracción en fase sólida (SPE) y posterior HPLC con derivatización de las aminas con OPA. La intensidad de la FL se realizó con 360 nm de excitación y 450 nm de emisión (Miyamoto et al., 2004). Los resultados fueron efectivos por lo que concluyeron que el método y la longitud de onda era idónea para la detección de histamina (Figura 10).

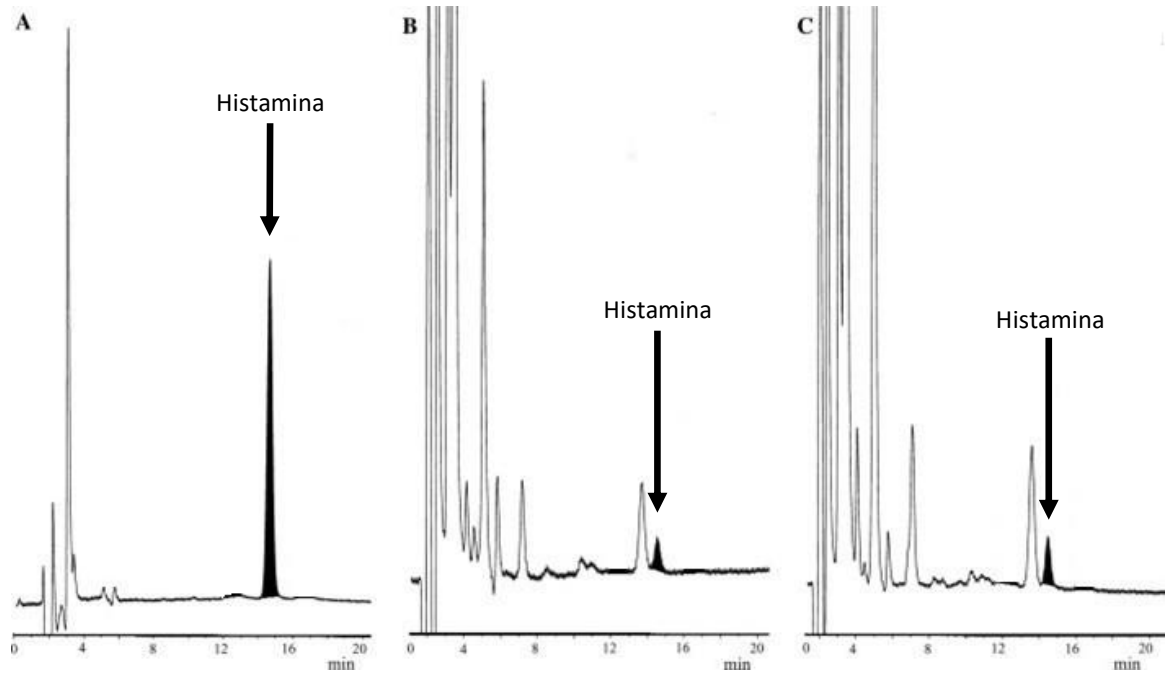


Figura 10. Cromatogramas de histamina con HPLC-FL. A. Muestras estándar con 2 ng de histamina. B. Extracto de cerebro de ratón. C. Extracto de cerebro de rata. Se observa que las concentraciones entre rata y ratón son muy similares (Modificado de Miyamoto et al., 2004).

2.3. Fase móvil para la detección de histamina por HPLC-FL

La fase móvil para la detección de histamina ha sido diversa, pero generalmente hay coincidencia en el uso de amortiguador para mantener el pH, por ejemplo, el amortiguador de fosfatos. El amortiguador es muy importante para evitar la degradación de histamina o de cualquier sustancia a analizar por la HPLC (Kounnoun et al., 2020; Lewis et al., 1992). La derivatización de histamina con OPA y N-acetil L-cisteína (**NAC**) fue validada en muestras de atún en el cual se utilizó el fosfato de potasio monobásico con resultados exitosos (Figura 11) (Tsiasioti & Tzanavaras, 2021). También se ha detectado histamina utilizando fosfato de potasio dibásico como amortiguador, realizando la cuantificación de histamina en muestras de atún, aunque utilizando OPA con ME (Kounnoun et al., 2020).

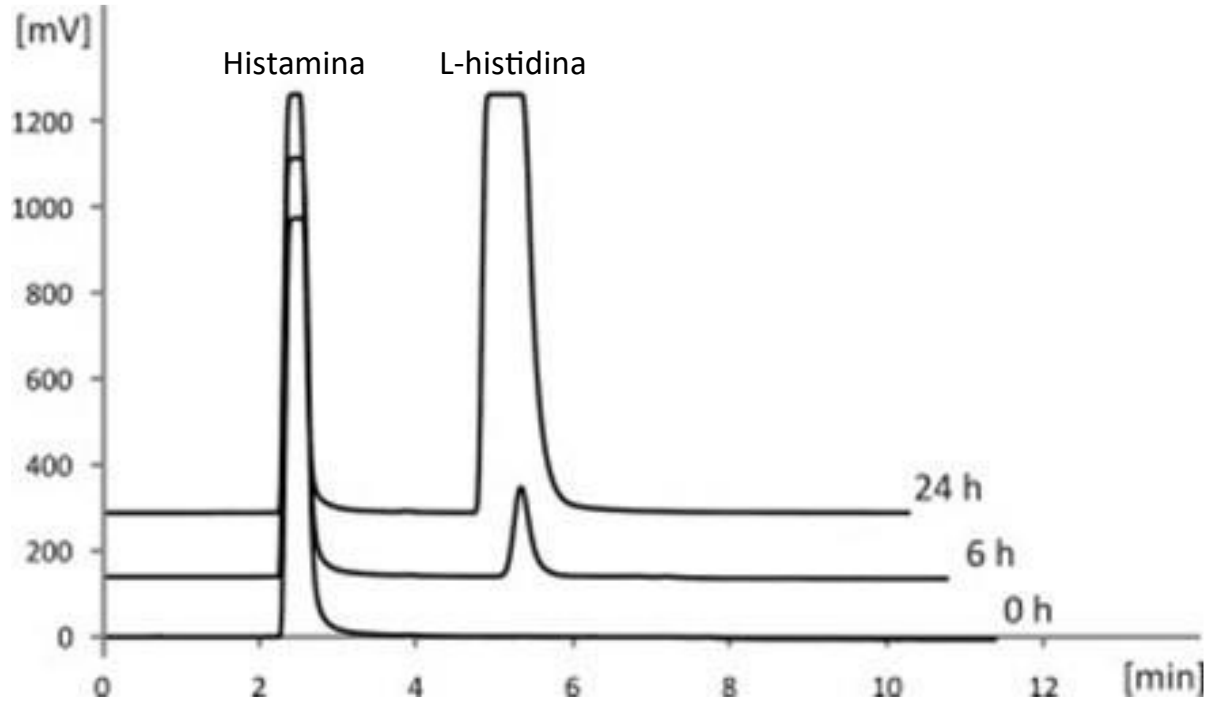


Figura 11. Cromatogramas de histamina y L-histidina con fosfato de potasio monobásico como amortiguador a partir de muestras de atún según el tiempo de almacenamiento de la fuente de extracción: 0 h, 6 h y 24 h.Es de destacar la conservación de la cuantificación de histamina (Modificada de Tsiasioti & Tzanavaras, 2021).

En menor medida, se han utilizado amortiguadores a base de acetato, tal que se ha validado para determinar histamina en sangre de pacientes con cáncer de colon (Previati et al., 2002).

Por otro lado, el eluyente también tiene mucha importancia porque su composición polar permite en mayor o menor medida la eficacia de separación de sustancias de una mezcla (Barwick, 1997). Recapitulando las tres investigaciones anteriores sobre los amortiguadores, cada una varió en la composición de eluyente polar. En uno no se agregó ningún otro eluyente (Tsiasioti & Tzanavaras, 2021); en otro se utilizó acetonitrilo (Kounnoun et al., 2020); mientras que en el último, se utilizó una mezcla de acetonitrilo y metanol para la fase móvil (Previati et al., 2002) (Figura 12). También se ha reportado el uso de tetrahidrofurano, en muestras de plasma sanguíneo para analizar histamina (Kuruma & Sakano, 1999).

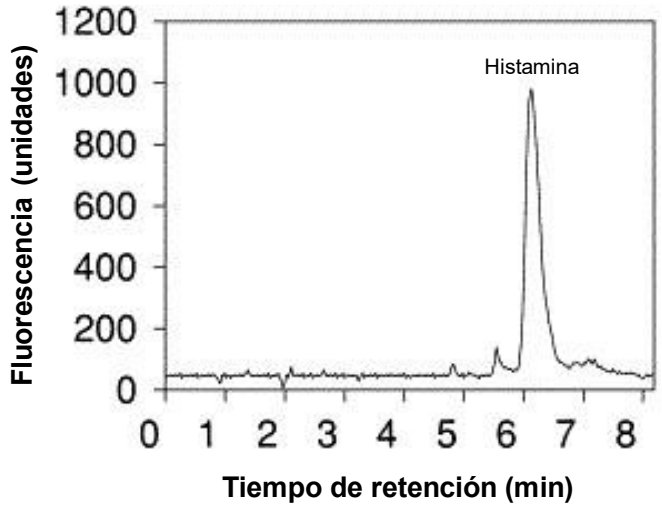


Figura 12. Cromatograma con la detección de histamina utilizando acetonitrilo y metanol en una muestra de sangre de un paciente con cáncer (Modificada de Previati et al., 2002).

2.4. Derivatizantes para la detección de histamina por HPLC-FL

Anteriormente se destacaron las ventajas del detector de FL para el análisis de histamina, por ello también es pertinente la revisión de derivatizantes para la detección de histamina con este tipo de detector. Si bien el OPA es el derivatizante de primera línea, otras sustancias se han explorado como el cloruro de dansilo (**DNS-Cl**). Otros investigadores reportaron la detección de histamina con el uso de DNS-Cl, que también resultó eficaz para la detección de otros neurotransmisores a partir de una solución extraída del queso (Figura 13) (Ramos et al., 2020).

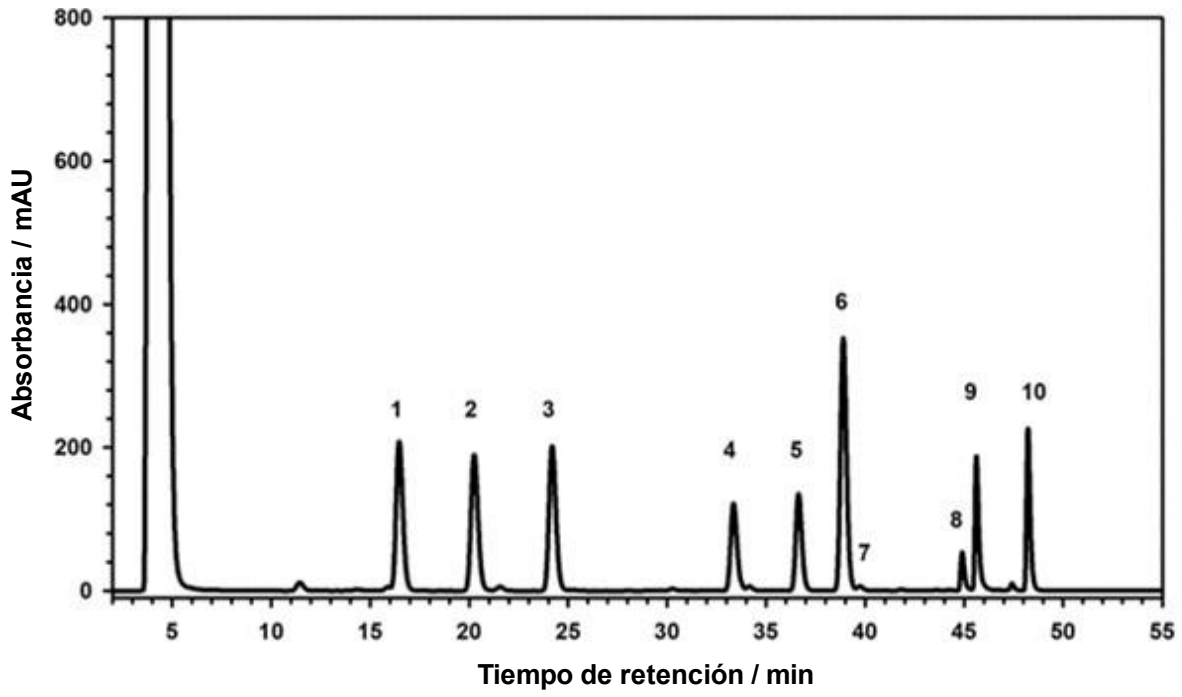


Figura 13. Cromatograma de aminas biogénicas usando cloruro de dansilo como derivatizante. 1, metilamina; 2, etilamina; 3, dimetilamina; 4, feniletilamina; 5, putrescina; 6, cadaverina; 7, histamina; 8, tiramina; 9, espermidina; 10, espermina. (Modificado de R. M. Ramos et al., 2020).

Otro derivatizante es 2,3-naftalenodicarboxaldehído (**NDA**), el cual se ha validado con tejidos nerviosos (Harrison et al., 2015). En dicho método derivatizaron con NDA como agente marcador fluorescente con el fin de detectar la histamina de ganglios y tejidos periféricos de la ostra *Crassostrea virginic*.

Otro derivatizante distinto que se ha reportado es el cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (**FMOC**), como lo reportan en un método con el cuál se detectó diversas aminas biogénicas entre ellas la histamina (Kirschbaum et al., 1994).

Además de los anteriores también se reportó como eficaz el 1,3,5,7-tetrametil-8-(N-hidroxisuccinimidil éster butírico)-difluoroboradiaza-s-indaceno (**TMBB-Su**), el cual se usó para derivatizar una solución extraída de leche y yogurt que contenía diversos

aminoácidos. Cabe decir que se requirió un tiempo de derivatización de 20 minutos y además el control de temperatura para mantenerse a 20 grados (Gao et al., 2011).

Adicionalmente también se ha reportado el 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (**AQC**). Es de resaltar que el AQC incluso se ha utilizado en muestras biológicas intracerebrales, por ejemplo en un análisis de neuroquímica cerebral durante el sueño en el cual investigaron los diferentes niveles de histamina durante la vigilia y sueño (Leenaars et al., 2019).

Otro derivatizante más es el éster succinimidílico del ácido 4-(1-pireno) butírico (**PSE**), el cual también se ha usado en muestras de líquido intracerebral obtenidas por microdiálisis de estructuras como hipotálamo, CPF, hipocampo y estriado; mostrando que los niveles de histamina aumentan durante el nado forzado (Figura 14) (Takashi Yoshitake, Yamaguchi, et al., 2003).

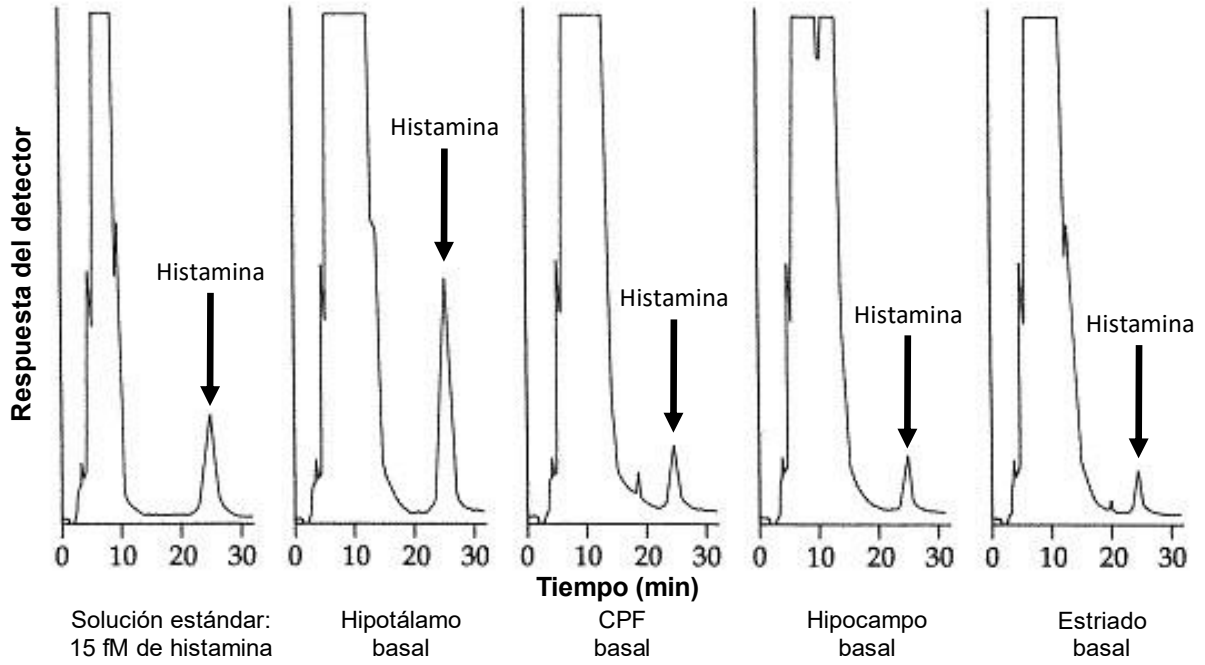


Figura 14. Cromatograma de histamina con un método que utilizó PSE como derivatizante para la histamina con diferentes muestras cerebrales extraídas de diversas áreas anatómicas (Modificado de Takashi Yoshitake et al., 2003).

Este mismo grupo de investigación reportó también el uso de Cloruro de 4-(1-pireno) butanoilo (**PBC**) para la derivatización de histamina con microdiálisis de muestras extraídas de piel de cerdo (T. Yoshitake et al., 2012).

Ahora bien, aunque la revisión de derivatizantes muestra una gran diversidad, el OPA ha demostrado tener amplia replicabilidad y accesibilidad de adquisición para el análisis de histamina, además de ser viable en casos de microdiálisis (una técnica muy útil para hacer estudios de neuroquímica). Resulta interesante que el OPA se puede usar sin ningún aditivo para derivatizar, sin embargo la derivatización se mejora usando otros agregados como ME (Kehr & Yoshitake, 2013) o NAC (Saito et al., 1992). Ambos funcionan como agentes reductores, lo cual fortalece la reacción entre OPA y la histamina (Figura 15) para una mejor señal de FL (Kounnoun et al., 2020; Larionova et al., 2008). Cabe decir también, que la combinación de OPA con ME se ha reportado como inestable (Jensen & Marley, 1995), teniendo una mejor conjugación el OPA/NAC (Zandy et al., 2017).

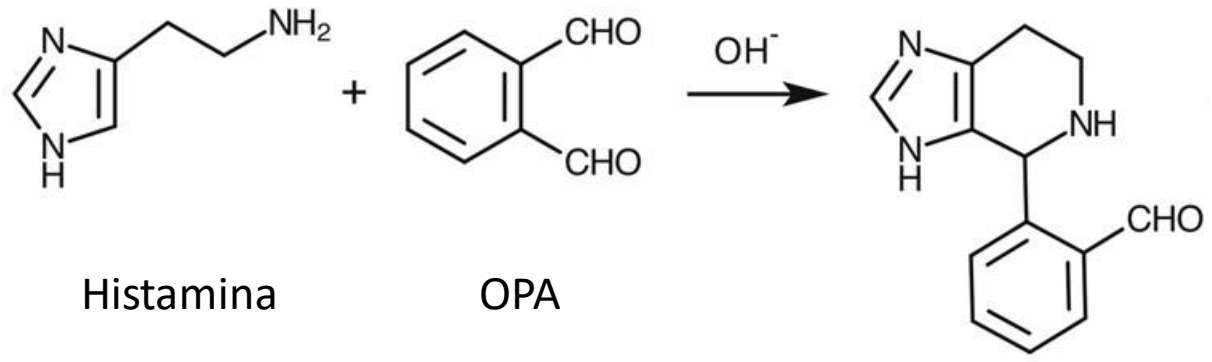


Figura 15. Reacción entre histamina y OPA. La reacción por sí sola resulta en un producto inestable, por lo que se agrega ME o NAC para estabilizarlo (Kehr & Yoshitake, 2013).

El OPA se ha usado en diversas concentraciones para el análisis de cuantificación de histamina. Se ha utilizado OPA en una concentración de 3.8 mM para poder detectar histamina pero en un detector electroquímico (Jensen & Marley, 1995). Por otro lado, también se ha reportado el uso de OPA a 5 mM para detectar histamina en muestras sanguíneas de pacientes con cáncer de colon (Previati et al., 2002). Incluso hay estudios

viejos en los que se ha utilizado una concentración menor de 2 mM de OPA para detector de fluorescencia de la HPLC (Saito et al., 1992).

2.5. Áreas cerebrales con presencia de histamina analizada por HPLC-FL

Para un estudio neuroquímico con HPLC es relevante la revisión de áreas del cerebro en dónde se ha detectado histamina. Se ha detectado histamina en el cerebro de diversos organismos mamíferos en áreas como el hipocampo (Brus et al., 2012; Jośko et al., 2011; Valle-Dorado et al., 2015) o el cuerpo estriado (V. Lozeva et al., 1998; Takashi Yoshitake, Yamaguchi, et al., 2003), el hipotálamo (Chen et al., 2016; Hegstrand & Hine, 1986; Maldonado & Maeyama, 2013b) y la CPF (Brus et al., 2012; Johnson et al., 2012; Violina Lozeva et al., 2004; Takashi Yoshitake, Yamaguchi, et al., 2003) son las áreas que cuentan con mayor evidencia.

Por un lado, el hipotálamo se destaca porque en él se encuentra el núcleo tuberomamilar, sitio de producción de la histamina cerebral. Por ejemplo, se han reportado niveles de histamina de 362 ± ng/g de tejido en el hipotálamo a partir de un grupo control de ratas tras extirpación de riñón (Tabla 3). Cabe señalar que estos datos no se obtuvieron con HPLC sino con un ensayo radioenzimático (Hegstrand & Hine, 1986).

Tabla 1. Cuantificación de histamina del hipotálamo de ratas nefrectomizadas y ratas control.

Grupo	*n*	*Histamina en el hipotálamo (ng/g de tejido)*	*Histamina en el cerebro entero excluyendo el hipotálamo (ng/g de tejido)*
Controles	4	362 ± 20	32 ± 7
Nefrectomizadas	4	464 ± 53	50 ± 7

Nota: (Modificado de Hegstrand & Hine, 1986).

También se reportaron resultados de la cuantificación de histamina por HPLC en hipotálamo con detector electroquímico para la detección de histamina en ratas control y ratas con deficiencia de mastocitos, indicando niveles de histamina basal detectables en el rango de 3.74 ± 0.25 nM/g (Figura 16) (Maldonado & Maeyama, 2013b).

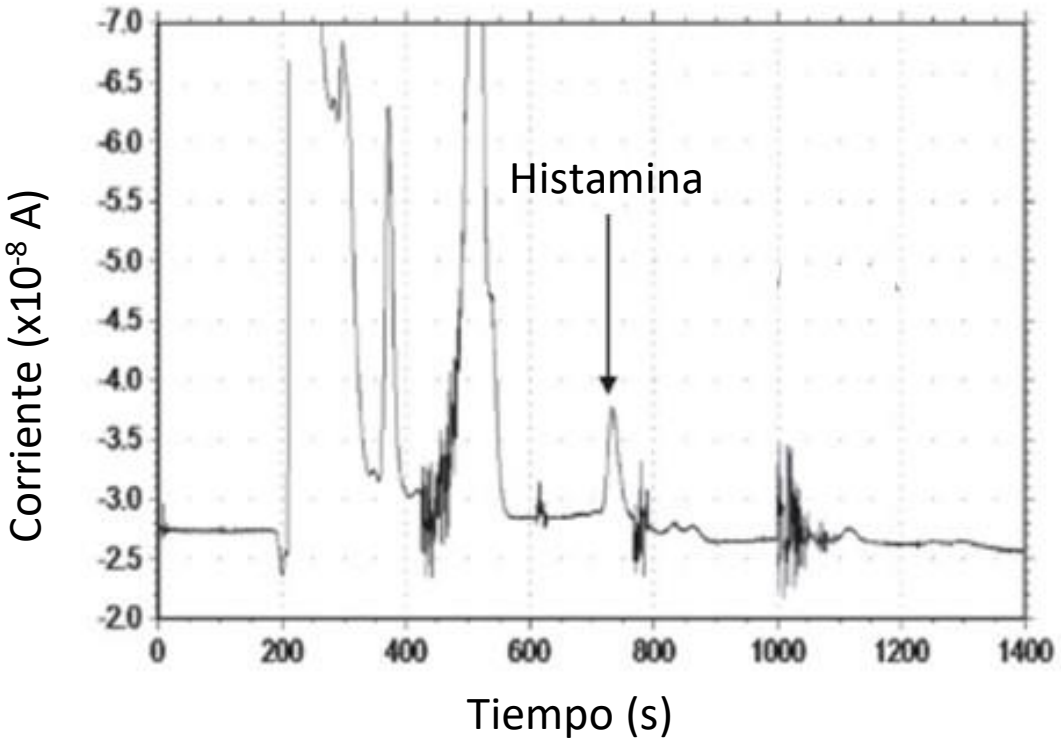


Figura 16. Cromatograma con señal de histamina a partir de muestras extraídas del hipotálamo de rata (Maldonado & Maeyama, 2013).

Un artículo con más complejidad metodológica, reportó el uso de microdiálisis para extraer muestras de líquido del hipotálamo en ratas en libre movimiento y detección por HPLC-electroquímica con niveles de histamina detectables en el rango de 8.2 ± 1.3 nM (Chen et al., 2016).

Por otro lado, respecto a la CPF, un estudio reportó el uso de detector de FL para determinar histamina, en el cual se utilizó también microdiálisis para extraer muestras de ratas y reportaron 9.05 fM en sus concentraciones basales (Takashi Yoshitake, Yamaguchi, et al., 2003). En la misma región cerebral, también se analizaron los niveles de histamina en modelos de ratas con encefalopatía hepática. Para este estudio se utilizó HPLC-FL y cabe decir que se extrajo el líquido a partir de tejidos homogeneizados. Sus resultados reflejaron una concentración basal de 0.39 nM por gramo de tejido en ratas control (Violina Lozeva et al., 2004).

Otro estudio realizó microdiálisis en la CPF y usó detector de FL; los resultados reflejaron que los niveles basales de histamina en el dializado en la CPF promediaron 1,6 nM en general para el grupo control sin alteraciones experimentales (Johnson et al., 2012)

También se ha usado el detector electroquímico de la HPLC para la cuantificación de histamina en la CPF. El estudio del efecto de la exposición al manganeso permitió reportar la existencia de histamina cerebral en un modelo de roedor de la enfermedad de Parkinson; específicamente la concentración basal que reportaron fue de 0.378 ± nM/g de tejido (Tabla 4) (Brus et al., 2012).

Tabla 2. Cuantificación de histamina en ratas con exposición a manganeso para el modelaje de enfermedad de Parkinson

Grupo	*Región cerebral*			
	Corteza frontal	Hipocampo	Hipotálamo	Médula oblongada
Control salino	0.378 ± 0.036	0.331 ± 0.071	1.629 ± 0.560	0.210 ± 0.052
Exposición al manganeso	0.454 ± 0.177	0.374 ± 0.162	1.461 ± 0.507	0.251 ± 0.047

Notas: Valores en nM/g. (Brus et al., 2012).

2.6. Histamina y su relación con el azúcar

Entre los estudios existentes, se ha reportado que la histamina cerebral y sus receptores están involucrados en la regulación de la obesidad, la cual está relacionada con el metabolismo de los azucares (Takayuki Masaki & Hironobu Yoshimatsu, 2007). Además, se ha demostrado que la administración periférica de L-histidina (como precursor de histamina) suprime la ingesta de alimentos a través de su conversión en histamina, lo cual fue correlacionado con las concentraciones de histamina en el hipotálamo (Yoshimatsu et al., 2002).

Por otro lado, también se ha observado una relación entre la histamina y el aprendizaje. En ratas con un modelo de aprendizaje asociativo (condicionamiento aversivo al sabor) donde se usó sacarina como elemento asociativo de un malestar gástrico inducido por

cloruro de litio, se realizó una inhibición del receptor H1 y una activación del receptor H3. Los resultados mostraron que el bloqueo de los receptores H1 en el núcleo basal magnocelular o la activación de los receptores H3 en la corteza insular perjudica la formación pero no la recuperación de la memoria gustativa aversiva (Purón-Sierra et al., 2010). En este sentido, se podría sospechar de una relación entre el sistema histaminérgico en el cerebro con procesos de aprendizaje y memoria.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los antecedentes muestran que se han descrito varios métodos de la HPLC para la detección de histamina, sin embargo, cada uno tiene sus pros y contras. De manera inicial, la HPLC tiene una gran ventaja para la cuantificación de unidades pequeñas de sustancias, y específicamente el detector de FL se destaca entre el resto de los detectores. Específicamente, cuando se busca realizar un método de la HPLC-FL con histamina, ésta necesita ser derivatizada para poder ser detectada y el OPA tiene una amplia evidencia de efectividad. Sin embargo, el uso de OPA requiere de complementos como ME o NAC. Si bien ya hay varios parámetros definidos para una correcta detección de histamina, hay incógnitas de relevancia como las variaciones de la fase móvil y la concentración del derivatizante. El reto no termina en el método, sino que se vuelve mayúsculo cuando hay que validar el método en muestras intracerebrales. De esta manera, surge la necesidad de un montaje, estandarización y validación de un método de la HPLC para determinación de las concentraciones basales de histamina por HPLC-FL en dializados de ratas en libre movimiento.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la fase móvil adecuada para la detección de histamina en la HPLC-FL con derivatizante OPA/NAC?

¿Cuál es la concentración eficiente de OPA para la detección de histamina por HPLC-FL?

¿Cuál es la concentración mínima detectable de histamina por HPLC-FL?

¿Se valida el método con muestras de dializados obtenidos por microdiálisis de rata en libre movimiento de la CPF?

5. HIPÓTESIS

1. El fosfato de potasio será una fase móvil eficiente para la detección de histamina como neurotransmisor cerebral.
2. El metanol será una fase móvil eficiente para la detección de histamina como neurotransmisor cerebral
3. El OPA a una concentración de 5 mM brindará una mejor detección para la histamina cerebral.
4. La concentración mínima de histamina cerebral estará en el rango entre 1-1000 fM.
5. El método será válido para la separación y cuantificación de muestras de microdiálisis cerebral de rata.

6. OBJETIVO

Encontrar las mejores condiciones para la separación y cuantificación de histamina por HPLC y detección por FL para el análisis de muestras de dializados de cerebro de rata.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar el fosfato de potasio y fosfato de sodio como amortiguador en el análisis de histamina por HPLC-FL.
2. Comparar el metanol y el acetonitrilo como solventes polares en el análisis de histamina por HPLC- FL.
3. Determinar la concentración de derivatizante ideal OPA/NAC para la detección de histamina por HPLC-FL.
4. Identificar la concentración mínima detectable de histamina por HPLC- FL.
5. Cuantificar la concentración de histamina en una muestra de dializado de rata.

8. JUSTIFICACIÓN

Las técnicas y herramientas en las neurociencias han evolucionado ampliamente en las últimas décadas. La HPLC es una de las técnicas más sofisticadas para el estudio de la comunicación neuronal. Dada la relevancia de los neurotransmisores en la comunicación neuronal, la HPLC puede ser usado para la separación y cuantificación de neurotransmisores como la histamina; la cuál ha tenido un protagonismo en procesos neurobiológicos como el ciclo sueño-vigilia (Arrigoni & Fuller, 2021) y recientemente sobre la memoria (Passani et al., 2017), utilizando el consumo de azúcares como modelo de aprendizaje (Purón-Sierra & Miranda, 2014).

Como ejemplo, se han estudiado los efectos de la histamina sobre la acetilcolina en procesos de memoria, pues una inyección del agonista del receptor H3 R-a-metilhistamina (RAMH) en la corteza insular (**CI**) deterioró el condicionamiento aversivo al sabor (**CAS**), a la vez que disminuyó la liberación cortical de Ach en la CI, de tal manera que la histamina provocó que continuara el consumo de azúcar como si no hubiera habido un malestar gástrico asociado (Purón-Sierra & Miranda, 2014).

Sin embargo, las proyecciones histaminérgicas también se dirigen a otras estructuras corticales como la como la corteza prefrontal medial (**CPFm**), la cual se ha demostrado que tiene un papel necesario para la evocación de preferencia al azúcar después de su consumo prolongado (Caynas-Rojas et al., 2019).

Dado el contexto, surge la relevancia del montaje, estandarización y validación de un método por HPLC-FL confiable que permita la cuantificación de la concentración de histamina en dializados de la CPF de ratas en libre movimiento.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Equipo

1. UHPLC, Dionex, Ultimate 3000, Thermo Scientific® con detección de FL, la cual fue de 340 nm para la excitación y de 450 nm para la emisión aplicadas a muestras de 25 µL cada una. El equipo de la HPLC Dionex cuenta con 4 bombas, pero sólo se utilizaron 2 para un flujo neto de 0.5 mL/min. La columna utilizada fue una Syncronis

C18, de dimensiones 250 x 4.6 mm con tamaño de partícula 5 µm, Thermo Scientific®. Para el análisis de los datos se utilizó el programa Chromeleon 6.8, propiedad de la misma compañía que el cromatógrafo.

2. Purificador de agua Thermo Scientific® Barnstead Easypure II
3. Balanza analítica marca Sartorius; modelo TE64
4. Potenciómetro marca Mettler Toledo® SevenEasy

9.2. Materiales

1. Micropipetas
2. Puntas para micropipetas
3. Agitador vórtex
4. Tubos de ensayo
5. Frascos
6. Vasos de precipitado
7. Matraces
8. Bala magnética
9. Sistema de filtración al vacío Millipore®
10. Microtubos para centrifugado
11. Tubos para microdiálisis
12. Viales ámbar 20 mL
13. Aluminio

9.3. Reactivos

1. Dihidrocloruro de histamina Sigma-Aldrich®
2. Ácido bórico Sigma-Aldrich®
3. Hidróxido de sodio Sigma-Aldrich®
4. O-ftalaldehído (**OPA**) Sigma-Aldrich®
5. Metanol grado HPLC J.T. Baker®
6. Acetonitrilo grado HPLC J.T. Baker®
7. N-acetil L-cisteína (**NAC**) Sigma-Aldrich®
8. Fosfato de sodio dibásico, 7-hidrato cristal J.T. Baker®
9. Fosfato de potasio dibásico, Sigma-Aldrich®

9.4. Diseño experimental

9.4.1. Montaje

El montaje consistió en evaluar 3 condiciones cromatográficas para determinar las mejores en la detección de histamina: comparar amortiguador de fosfatos, comparar solvente polar y cantidad de derivatizante OPA/NAC. Para las evaluaciones de montaje se utilizó una solución stock de histamina (100µM) preparada con dihidrocloruro de histamina disuelta en ácido clorhídrico (**HCl**) al 0.05 M.

Los parámetros analizados empezaron considerando las siguientes condiciones iniciales:

Fase móvil:

- A: Amortiguador de fosfato. 46 %
- B: Metanol. 54%

OPA a 2.5 mM

Flujo isocrático: 0.5 mL/min

Longitud de onda:

- Ex: 340 nM
- Em: 450 nM

Tiempo de análisis: 17 minutos

Inyección de muestra: 25 µL

Todas las corridas de muestras tuvieron un proceso de derivatización precolumna que la HPLC realizó de forma automatizada. Una aguja del automuestrador de la HPLC tomaba 25 µL de solución derivatizante y los colocaba en un tubo que contenía 25 µL de la muestra con histamina. Se utilizó un tiempo de espera de 2 minutos con agitación para luego tomar 25 µL de la mezcla e inyectarlo en el loop de inyección de la HPLC para su posterior separación y detección.

Todas las secuencias por analizar en las evaluaciones de montaje consistieron en:

1. 25 µL del propio derivatizante (para determinar la señal de ruido de la línea base)
2. 25 µL de histamina 50 pM

3. 25 µL de histamina 20 pM
4. 25 µL de histamina 1 pM

9.4.1.1. Parámetros cromatográficos para evaluar

1. Análisis de amortiguador fosfato: fosfato de potasio y fosfato de sodio.

   Se evaluaron análisis de histamina con fosfato de sodio y fosfato de potasio utilizando metanol para la fase móvil. El fosfato de sodio se preparó a 0.05M, al igual que el fosfato de potasio. Se utilizó un flujo de 0.7 mL/min con una distribución 46% amortiguador / 54% eluyente polar.
2. Análisis de solvente polar: metanol y acetonitrilo.

   Se eligió el amortiguador fosfato más efectivo y se utilizó para evaluar el eluyente polar entre metanol y acetonitrilo. Se manejó un flujo de 0.7 mL/min con una distribución 46% amortiguador / 54% eluyente polar.
3. Análisis de cantidad de OPA/NAC: 2.5 mM y 5 mM

   Se eligió amortiguador fosfato y el solvente polar más efectivo para evaluar la mejor concentración de OPA/NAC entre 2.5 mM y 5 mM. Se prepararon las dos soluciones derivatizantes y se analizaron muestras de histamina con cada una de ellas utilizando fosfato de sodio como amortiguador y metanol como solvente polar. Se manejó un flujo de 0.7 mL/min con una distribución 46% amortiguador / 54% eluyente polar.

   La solución de OPA/NAC 5 mM se describe a continuación:

   • Se disolvió 5 mg de OPA en 250 µL de metanol grado HPLC y se vortexeó hasta obtener una mezcla homogénea.

   • Después se agregaron 4.5 mL de ácido bórico 0.4 M y pH ajustado a 10.4.

   • A continuación se agregó 6 mg de NAC y se vortexeó hasta que se disolvieron todos los cristales.

   • Posteriormente se filtró la solución con una jeringa con filtro 0.22µm y se vació en un vial ámbar cubierto de aluminio.

   La solución de OPA 2.5 mM se describe a continuación:

   • Se disolvió 2.5 mg de OPA en 250 µL de metanol grado HPLC y se vortexeó hasta obtener una mezcla homogénea.

   • Después se le agregó 4.5 mL de ácido bórico 0.4 M y pH ajustado a 10.4.

• A continuación se agregó 3 mg de NAC y se vortexeó hasta que se disolvieron todos los cristales.

• Posteriormente se filtró la solución con una jeringa con filtro 0.22µm y se vació en un vial ámbar cubierto de aluminio.

9.4.2. Estandarización

Para la estandarización se analizaron muestras de 1, 20, 50 y 100 pM a partir de un stock de histamina (100µM), con lo cual se realizaron las curvas de calibración y con ello una regresión lineal.

9.4.3. Validación

Para la validación del método se usaron los parámetros de amortiguador fosfato, eluyente polar y el derivatizante más efectivos determinados en el montaje para analizar muestras de dializados obtenidos por microdiálisis de la CPF de ratas en libre movimiento. El método se probó en dos grupos de ratas adultas de la cepa wistar con consumo de agua y alimento ad libitum por 21 días; el primer grupo se refiere al control experimental teniendo agua simple para beber, mientras que el otro grupo consistió en un modelo de dieta azucarada administrada a través del agua con azúcar al 10%. Al día 22, se le realizó microdiálisis a ambos grupos para obtener muestras de líquido intracerebral en su estado basal de la CPF.

9.5. Integración y análisis estadístico

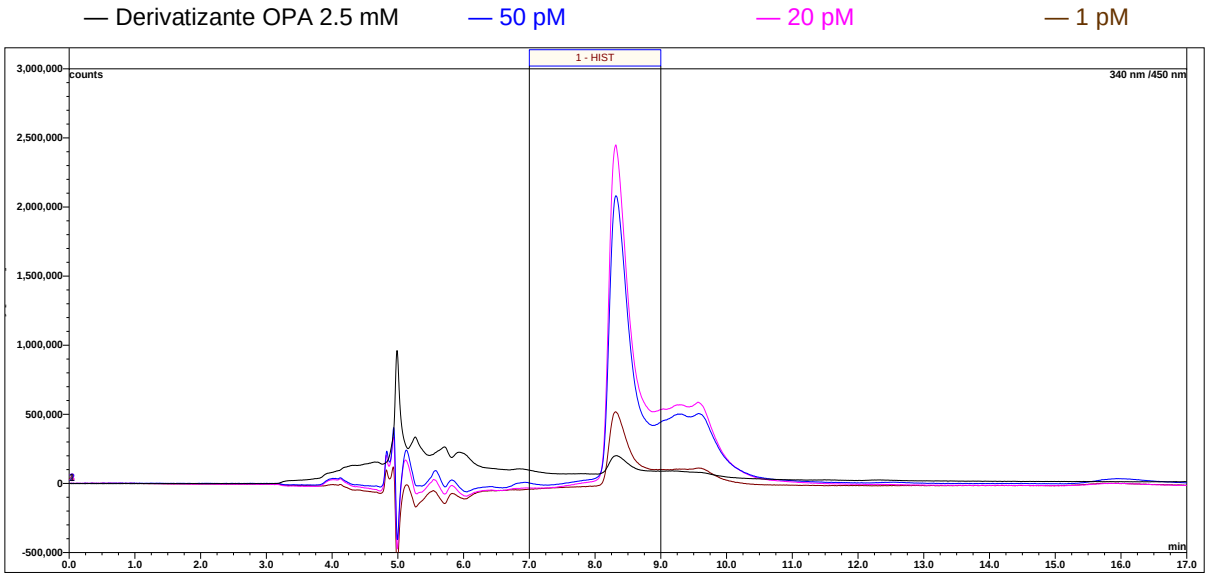
Para la integración de los picos obtenidos se utilizó el software Chromeleon 6.8., para el análisis estadístico Statview 5.0.1 y GraphPrism 8 para la presentación de las gráficas.

10. RESULTADOS

10.1. El amortiguador de fosfato de sodio en la fase móvil es eficiente para la detección de histamina.

Lo primero que se realizó fue un análisis para comparar la mejor detección de histamina utilizando dos tipos de fosfatos para la fase móvil: fosfato de potasio (Figura 17) y fosfato de sodio (Figura 19). De igual manera se utilizaron los coeficientes de correlación [r_{fospot}= 0.64182, (Figura 18); $r_{fossod=}$ 0.96230, (Figura 20) y se demostró que no hay diferencia significativa entre el uso de dichas concentraciones [Transformación Z de Fisher; Z = 0;

p= 0.5]. A pesar de la falta de significancia, se puede identificar que el coeficiente de correlación de los análisis con fosfato de sodio tiene mejor correlación que los análisis con fosfato de potasio por lo que se determinó utilizar esta condición para los siguientes análisis.



No. muestra	Nombre de muestra	Tiempo de retención	Área counts*min	Altura counts	Cantidad pM/uL
1	Derivatizante OPA 2.5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	50 pM	8.317	604700.4383	1918763.00	38.85829348
3	20 pM	8.316	737450.2410	2279909.00	47.38884921
4	1 pM	8.311	160415.1487	501108.00	10.308342

*Figura 17. Integración del método para un análisis con amortiguador fosfato de potasio. Superior: Cromatograma del análisis con muestras de 50, 20, 1 pM de histamina; Inferior: Resultados del pico de histamina para cada muestra. Área counts*min: área bajo la curva del pico lo cual significa el cálculo del área bajo la curva del pico y que sirve para calcular la concentración. Altura counts: altura del pico en intensidad de señal. Cantidad pM/µL: cantidad de histamina en pM/25µL.*

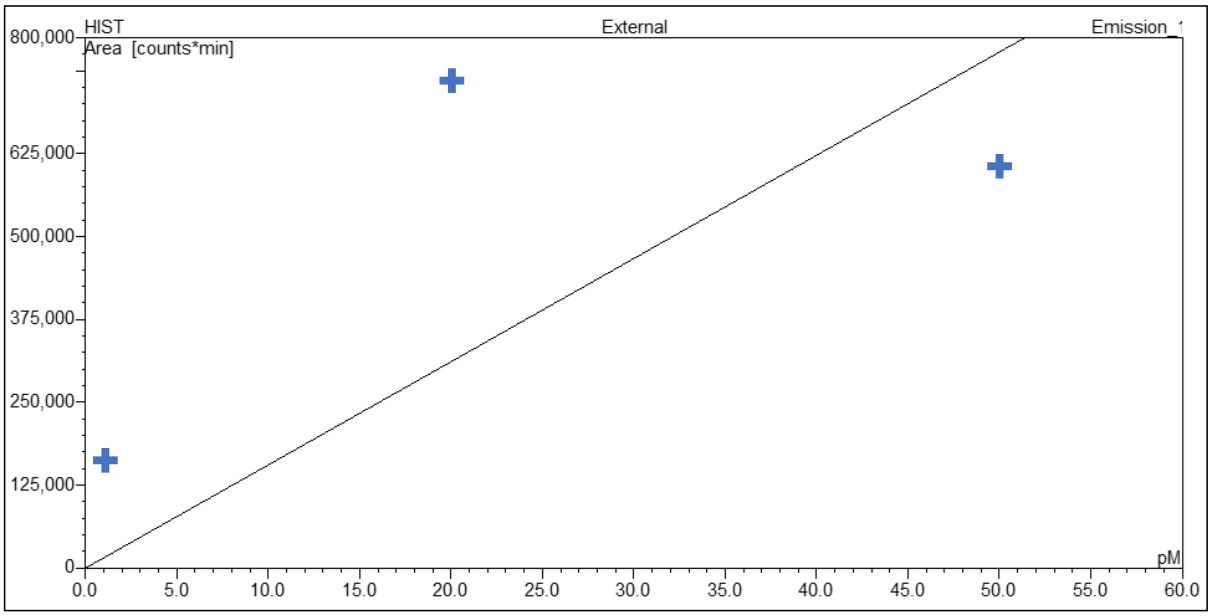
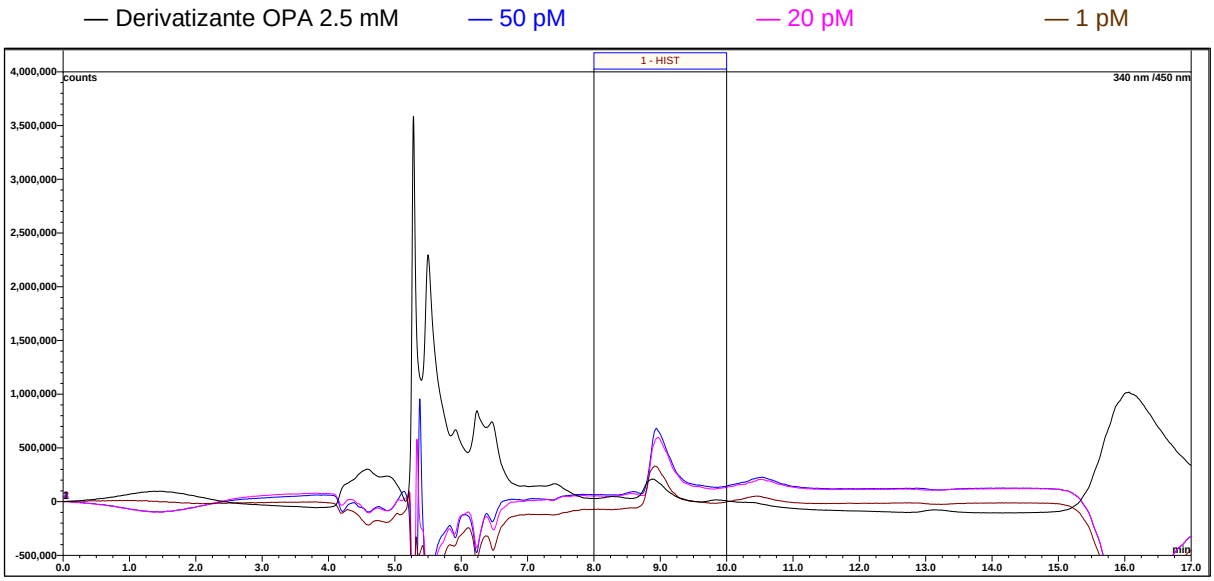


Figura 18. Regresión lineal del análisis de muestras con amortiguador fosfato de potasio. El análisis de correlación reflejó un coeficiente de 64.182% [r=0.64].



No. muestra	Nombre de muestra	Tiempo de retención	Área counts*min	Altura counts	Cantidad pM/uL
1	Derivatizante OPA 2.5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	50 pM	8.941	198797.4350	592587.00	42.82983482
3	20 pM	8.967	170171.3883	520552.00	36.66250751
4	1 pM	8.916	121878.7010	367714.00	26.25810857

*Figura 19. Integración del método para un análisis con amortiguador fosfato de sodio. Superior: Cromatograma del análisis con muestras de 50, 20, 1 pM de histamina; Inferior: Resultados del pico de histamina para cada muestra. Área counts*min: área bajo la curva del pico lo cual significa el cálculo del área bajo la curva del pico y que sirve para calcular la concentración. Altura counts: altura del pico en intensidad de señal. Cantidad pM/µL: cantidad de histamina en pM/25µL.*

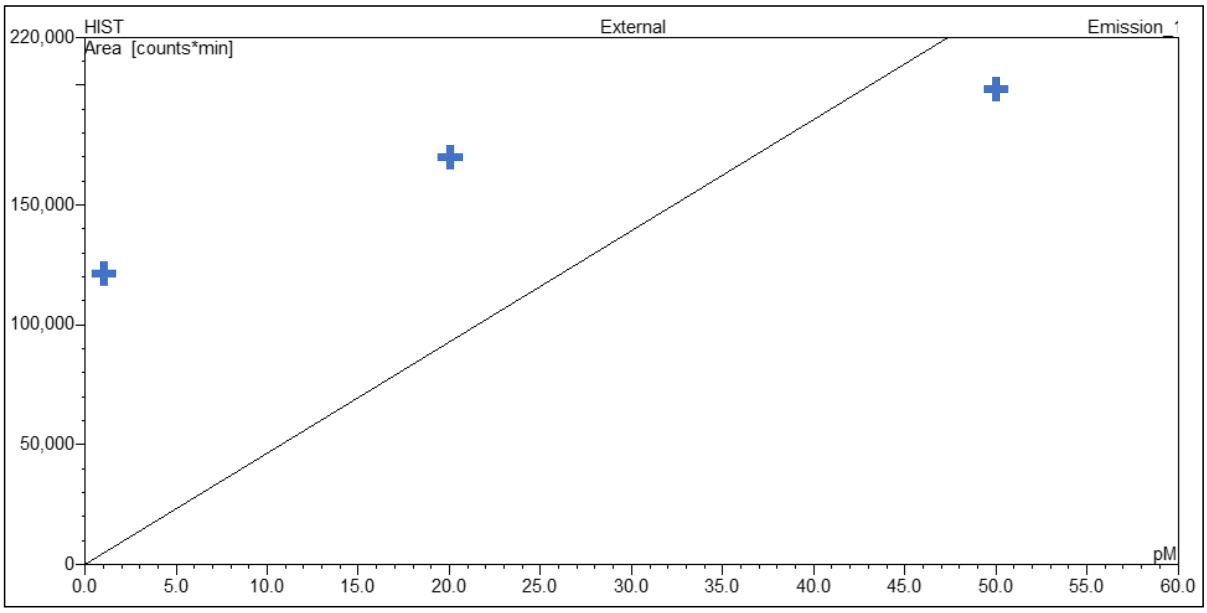
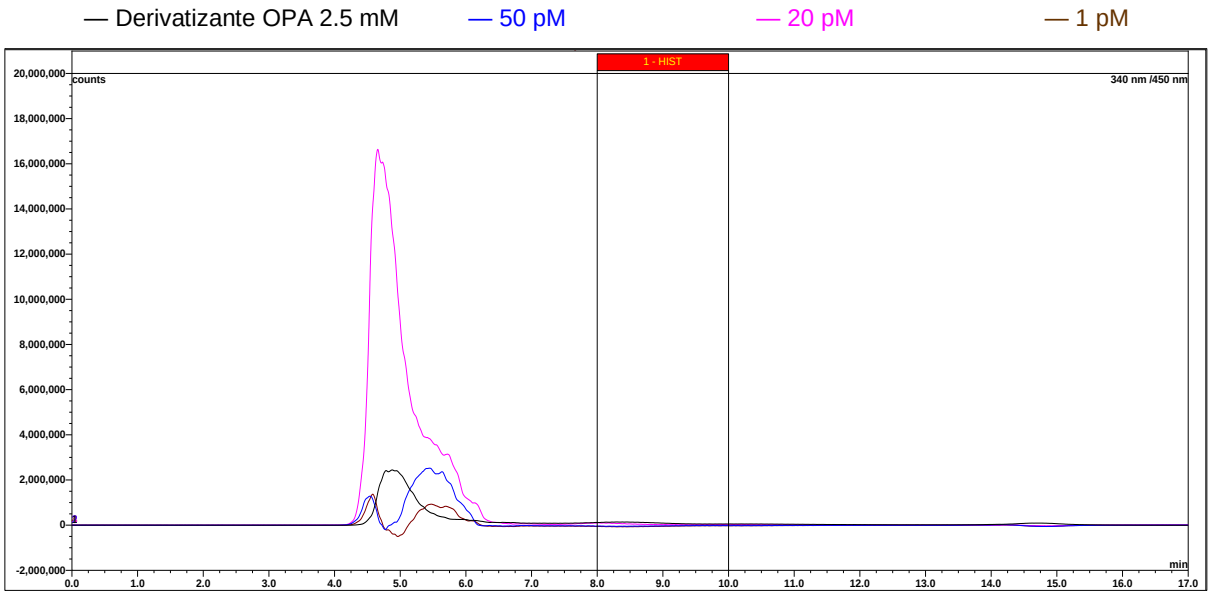


Figura 20. Regresión lineal del análisis de muestras con amortiguador fosfato de sodio. El análisis de correlación reflejó un coeficiente de 96.230 % [r=0.96].

10.2. El metanol es un eluyente polar eficiente para la detección de histamina

Posteriormente se realizó un análisis para comparar la mejor detección de histamina utilizando dos tipos de eluyentes polares en la HPLC: metanol (Figura 17) y acetonitrilo (Figura 21). En este análisis se demostró que la fase móvil con acetonitrilo no produce una detección de histamina por lo que no tuvo cabida la realización de pruebas estadísticas, por lo tanto, se reafirmó que el uso de metanol es un eluyente efectivo para la detección de histamina y se utilizó en los posteriores análisis.



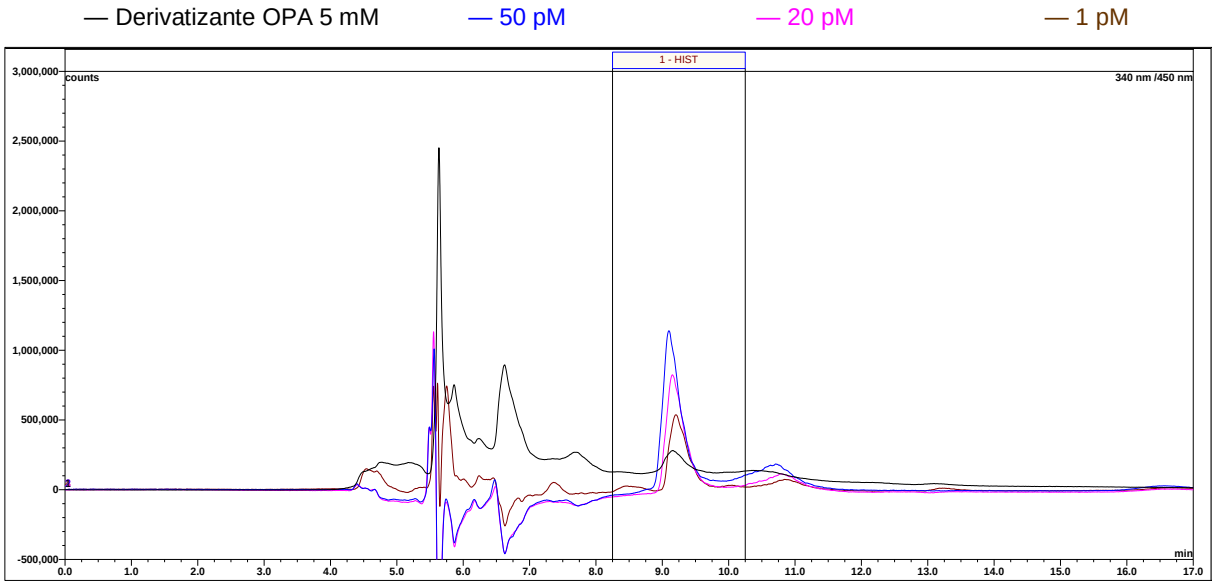
No. muestra	Nombre de muestra	Tiempo de retención	Área counts*min	Altura counts	Cantidad pM/uL
1	Derivatizante OPA 2.5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	50 pM	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3	20 pM	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4	1 pM	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

*Figura 21. Integración del método para un análisis con acetonitrilo. Superior: Cromatograma del análisis con muestras de 50, 20, 1 pM de histamina; Inferior: Resultados del pico de histamina para cada muestra. Área counts*min: área bajo la curva del pico lo cual significa el cálculo del área bajo la curva del pico y que sirve para calcular la concentración. Altura counts: altura del pico en intensidad de señal. Cantidad pM/µL: cantidad de histamina en pM/25µL.*

10.3. El derivatizante OPA/NAC a 2.5 mM es una opción eficiente para la detección de histamina

En los ensayos para comparar la mejor detección de histamina utilizando OPA/NAC 2.5 mM (Figura 17) y OPA/NAC 5 mM (Figura 22) los coeficientes de correlación entre análisis de histamina con ambas concentraciones [$r_{OPA2.5=}$ 0.96230, (Figura 18)]; r_{OPA5}= 0.98243, (Figura 23)] se demostró que no hay diferencia significativa entre el uso de dichas concentraciones [Transformación Z de Fisher; Z = 0; p= 0.5]. Dada la falta de

significancia, se eligió el OPA a 2.5 mM para los análisis posteriores de histamina, pues permite el ahorro de recursos manteniendo la capacidad de detección en la HPLC.



No. muestra	Nombre de muestra	Tiempo de retención	Área counts*min	Altura counts	Cantidad pM/uL
1	Derivatizante OPA 5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	50 pM	9.099333333	349449.289	1121948	44.13461584
3	20 pM	9.152666667	266607.2377	833794	33.67186137
4	1 pM	9.206	164943.5657	531800.00	20.83198088

*Figura 22. Integración del método para un análisis con OPA 5 mM. Superior: Cromatograma del análisis con muestras de 50, 20, 1 pM de histamina; Inferior: Resultados del pico de histamina para cada muestra. Área counts*min: área bajo la curva del pico lo cual significa el cálculo del área bajo la curva del pico y que sirve para calcular la concentración. Altura counts: altura del pico en intensidad de señal. Cantidad pM/µL: cantidad de histamina en pM/25µL.*

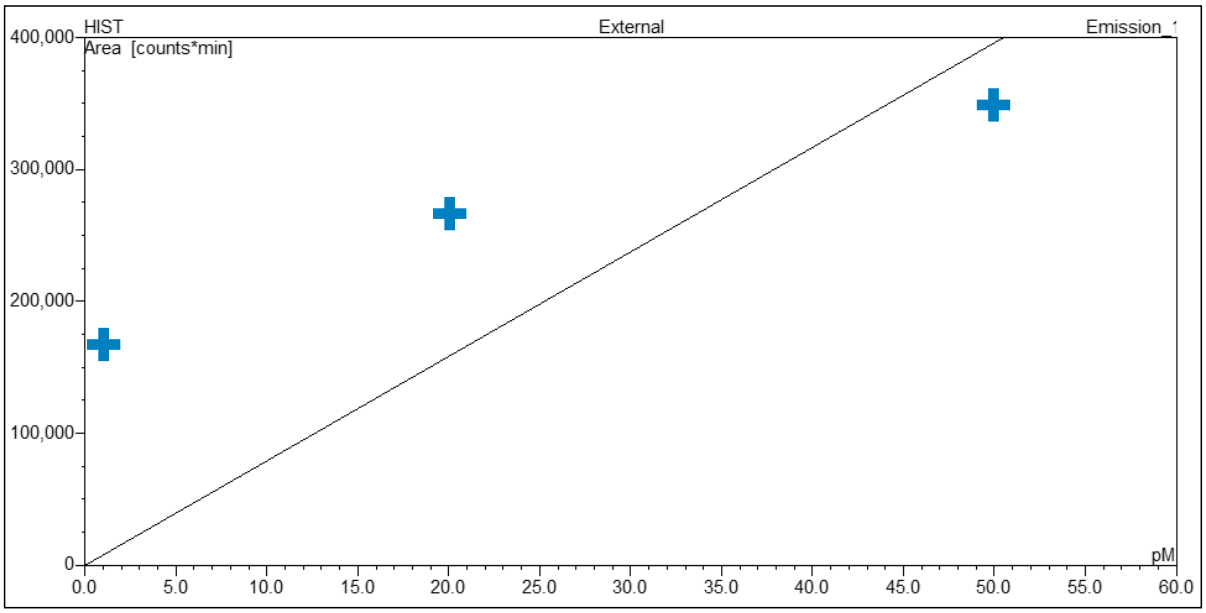
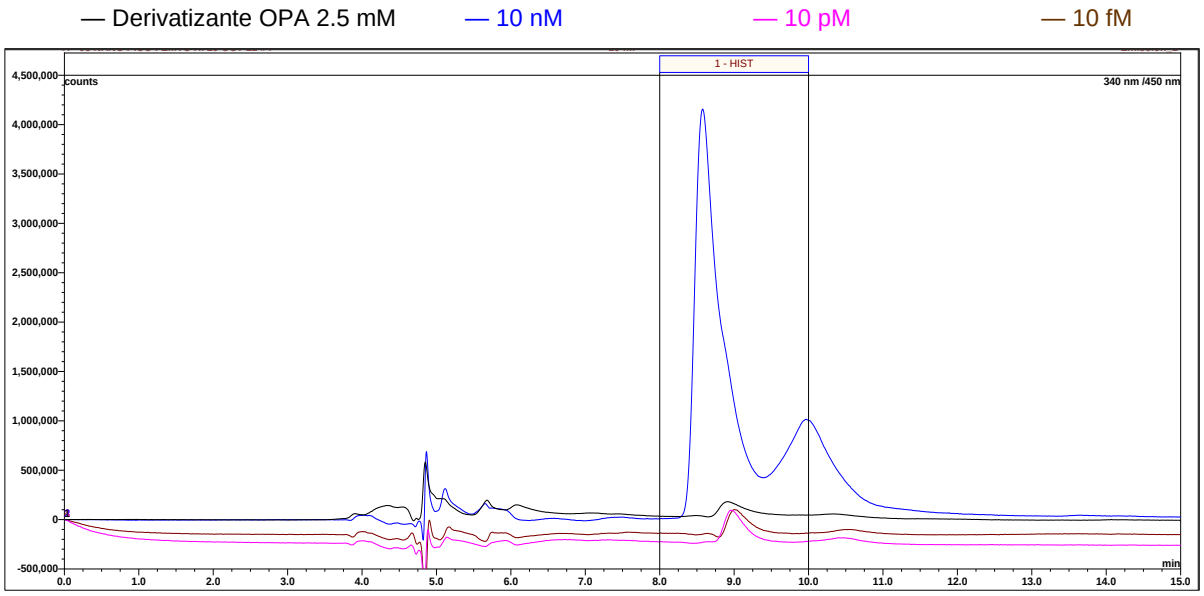


Figura 23. Regresión lineal del análisis de muestras con OPA 5 mM. El análisis de correlación reflejó un coeficiente de 98.243% [r=0.98].

10.4. La detección mínima de histamina se probó en el rango de picomolar

Una vez que los experimentos previos determinaron las mejores condiciones cromatográficas en términos de amortiguador, eluyente polar y concentración de derivatizante (fosfato de sodio, metanol y OPA/NAC a 2.5 mM, respectivamente), se utilizaron dichos parámetros para los análisis de estandarización y validación del método. Con el fin de determinar la cantidad mínima detectable de histamina en la HPLC-FL se realizaron pruebas con stocks de nM, pM, fM, detectándose histamina en los tres niveles de cantidades [$r_{npf=}$ 0.99999, Figura 24]. Sin embargo, lamentablemente por problemas técnicos del equipo, ya no fue posible realizar una curva de concentración válida de las muestras en fM (Figura 25), por lo que se decidió realizar un análisis de concentraciones en el rango de pM con 1, 10, 50 y 100 pM de histamina (Figura 26). La regresión lineal correspondiente arrojó un coeficiente de correlación de 0.97654 (Figura 27).



No. muestra	Nombre de muestra	Tiempo de retención	Área counts*min	Altura counts	Cantidad pM/uL
1	Derivatizante OPA 2.5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	10 nM	8.577	1548440.6610	4027341.00	9999.391924
3	10 pM	8.974	95623.1933	313305.00	617.5075424
4	10 fM	9.010	88099.5513	267381.00	568.9219899

*Figura 24. Integración del método para un análisis de unidades estándares de histamina. Superior: Cromatograma del análisis con muestras de 10 nM, 10 pM y 10 fM de histamina; Inferior: Resultados del pico de histamina para cada muestra. Área counts*min: área bajo la curva del pico lo cual significa el cálculo del área bajo la curva del pico y que sirve para calcular la concentración. Altura counts: altura del pico en intensidad de señal. Cantidad pM/µL: cantidad de histamina en pM/25µL.*

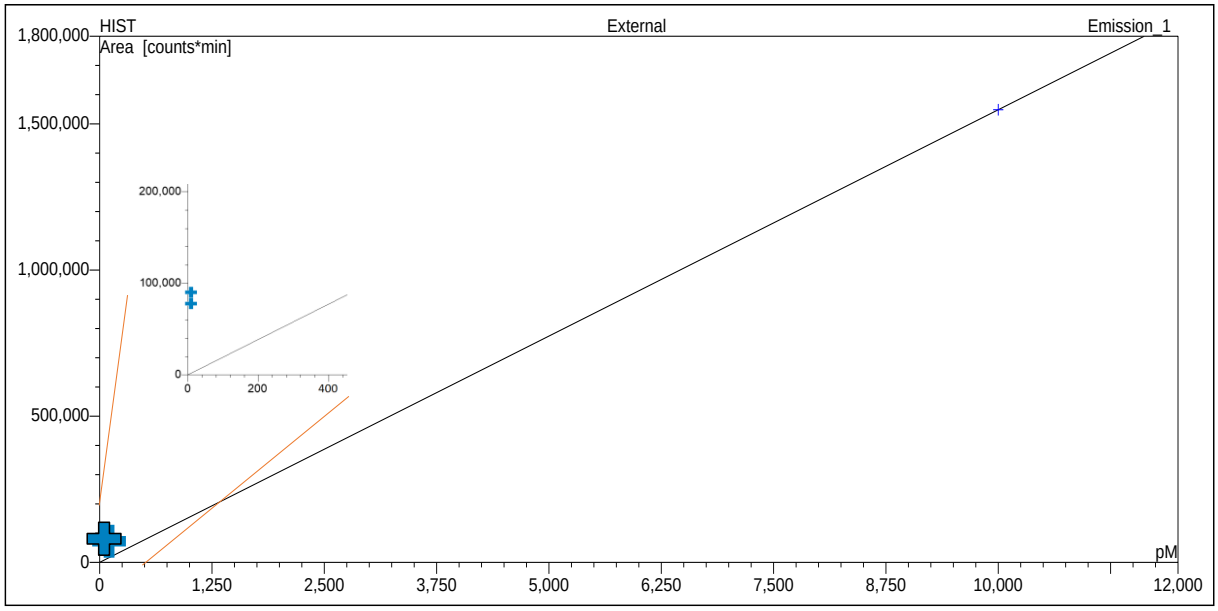
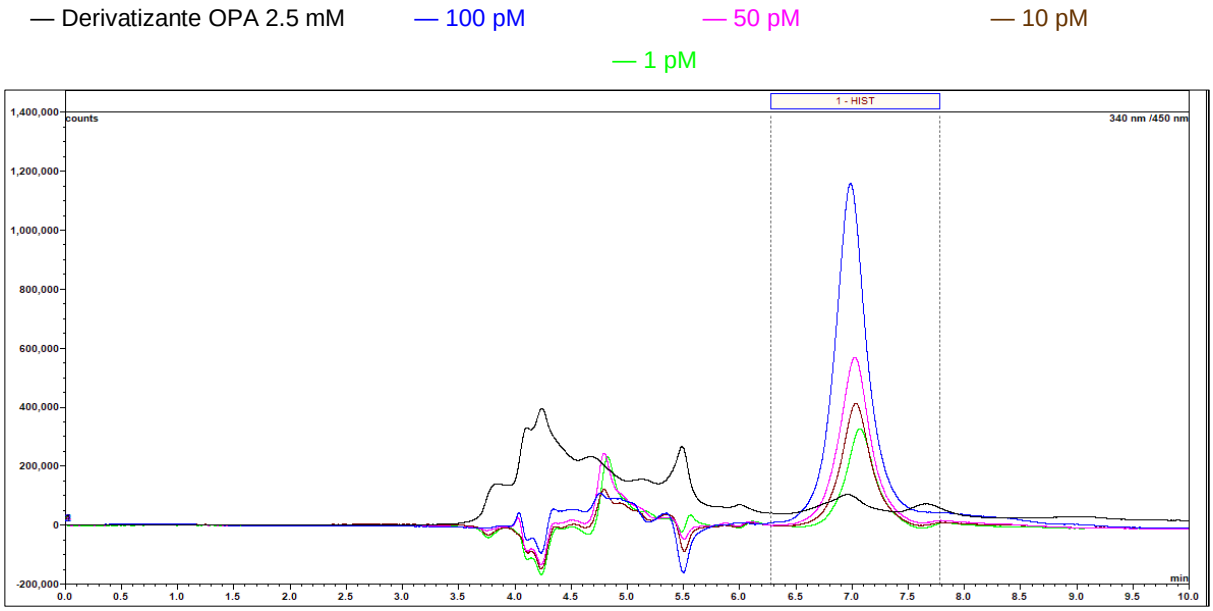


Figura 25. Regresión lineal del análisis de unidades estándares de histamina. El análisis de correlación reflejó un coeficiente de 99.999 % [r=0.99].



No. muestra	Nombre de muestra	Tiempo de retención	Área counts*min	Altura counts	Cantidad pM/uL
1	Derivatizante 3.5	6.959333333	23995.25933	62391	6.122304236
2	100 pM	6.986666667	383794.6603	1130561	97.92382912
3	50 pM	7.024	191176.5167	560247	48.77800159
4	10 pM	7.033333333	133916.4193	411588	34.16829341
5	1 pM	7.074	109874.462	334602	28.03407435

*Figura 26. Integración del método para un análisis con estándares en pM de histamina. Superior: Cromatograma del análisis con muestras de 100, 50, 10 y 1 pM de histamina; Inferior: Resultados del pico de histamina para cada muestra. Área counts*min: área bajo la curva del pico lo cual significa el cálculo del área bajo la curva del pico y que sirve para calcular la concentración. Altura counts: altura del pico en intensidad de señal. Cantidad pM/µL: cantidad de histamina en pM/25µL.*

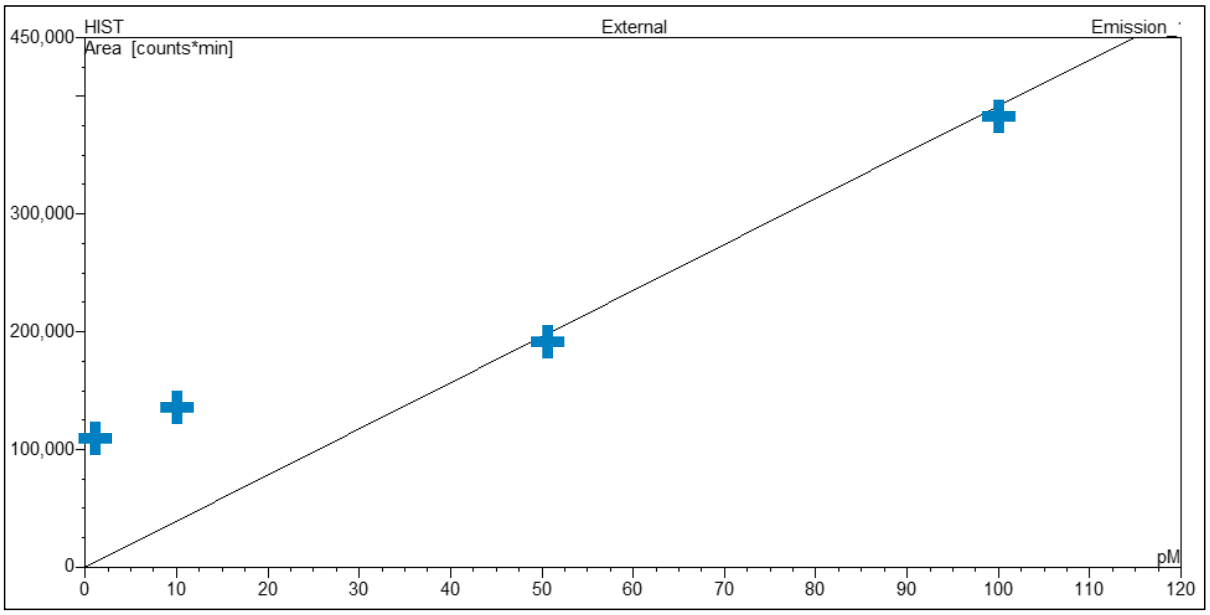
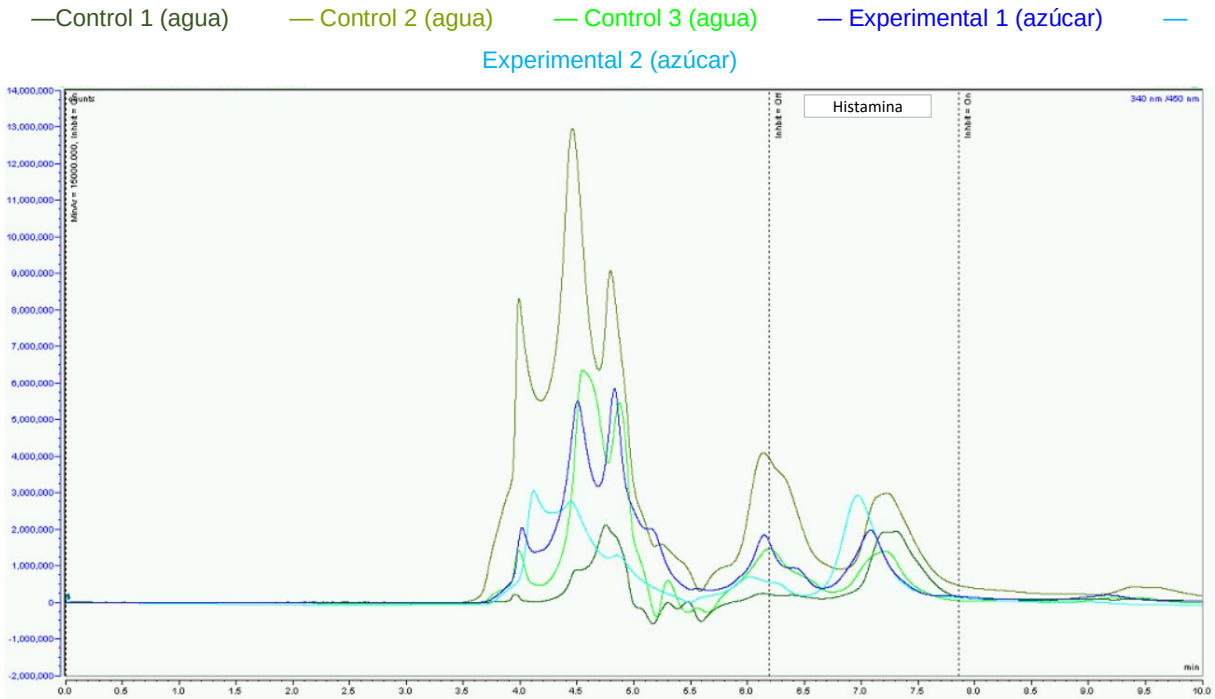


Figura 27. Regresión lineal del análisis con estándares en pM de histamina. El análisis de correlación reflejó un coeficiente de 97.654% [r=0.97].

10.5. Validación del método con la cuantificación de histamina en ratas con dieta azucarada y las ratas con dieta normal.

Después de determinar las variables más idóneas para la detección de histamina (fosfato de sodio, metanol y OPA/NAC a 2.5 mM), se procedió a validar el método en dializados obtenidos por microdiálisis en la CPF en ratas en libre movimiento. Los grupos consistieron en 3 ratas que consumieron una dieta normal con agua simple y 2 ratas con dieta azucarada a través de agua al 10% de sacarosa. Los resultados reflejaron una detección de histamina en el rango de pM en todas las muestras analizadas, independientemente de los grupos [promedio; Agua= 96.537 pM, Azúcar= 211.293 pM, (Figura 28)]. Debido a que el grupo de ratas con dieta azucarada se realizó con un análisis de 2 ratas no permite realizar pruebas estadísticas dejando estos resultados como preliminares (Figura 29).



No. muestra	Nombre de muestra	Tiempo de retención	Área counts*min	Altura counts	Cantidad pM/uL
1	Control 1 (agua)	7.298	855477.1493	1818777	92.05944399
2	Control 2 (agua)	7.225333333	994767.1877	2257877	107.0486971
3	Control 3 (agua)	7.197333333	514323.1107	1205247	90.5026478
	Promedio:	7.240	788189.149	1760633.667	96.537
1	Experimental 1 (azúcar)	7.08	578488.8173	1681850	147.599344
2	Experimental 2 (azúcar)	6.967333333	1077757.699	2756988	274.986006
	Promedio:	7.024	828123.258	2219419.000	211.293

*Figura 28. Integración del método para un análisis con muestras de CPF con microdiálisis para ratas. Superior: Cromatograma del análisis con muestras con dieta azucarada (azules) y dieta normal (verdes). Los cromatogramas de cada rata pueden variar en comparación con otra rata ya que cada una tuvo su propia curva de calibración con las condiciones de medición para dicho análisis particular.; Inferior: Resultados del pico de histamina para cada muestra. Área counts*min: área bajo la curva del pico lo cual significa el cálculo del área bajo la curva del pico y que sirve para calcular la concentración. Altura counts: altura del pico en intensidad de señal. Cantidad pM/µL: cantidad de histamina en pM/25µL.*

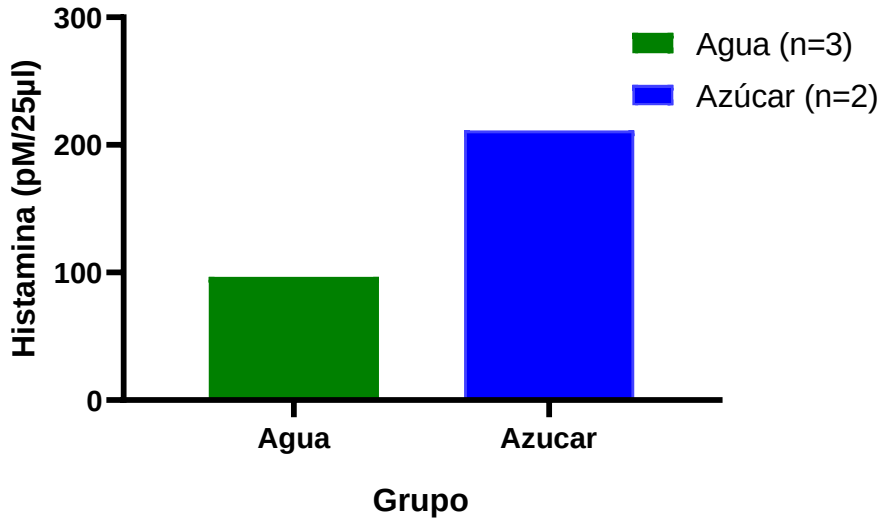


Figura 29. Cuantificación de histamina para ratas con dieta normal y dieta azucarada.

11. DISCUSIÓN

11.1. Montaje

Lo primero que se sometió a evaluación fue la fase móvil. Por un lado, el amortiguador que se consideró inicialmente según los antecedentes fue el fosfato de potasio que ha sido ampliamente utilizado como se demostró en los antecedentes, sin embargo, ante la existencia de distintos tipos de fosfatos en la literatura, fue pertinente una evaluación comparando fosfato de potasio y fosfato de sodio. Los antecedentes demostraban que el fosfato de potasio era un amortiguador efectivo (Kounnoun et al., 2020; Tsiasioti & Tzanavaras, 2021), y funcionó bien para el análisis, de tal manera que se logró la detección de la histamina. Sin embargo, el fosfato de sodio dió mejores resultados según los coeficientes de correlación de las curvas de calibración. Lo anterior tiene consistencia con estudios en la HPLC con detectores electroquímicos como se demostró anteriormente, utilizando fosfato monosódico en combinación con metanol para la fase móvil (Chen et al., 2016). Otro artículo reportó la eficacia del fosfato de sodio para la detección de histamina en la HPLC con detector electroquímico; verificando la eficacia

del fosfato de sodio como un amortiguador eficiente para la detección de histamina en un detector de FL (Hsieh et al., 2018). En este sentido, se rechazó la hipótesis inicial en la que se consideraba que sería el fosfato de potasio el amortiguador ideal, sin embargo no fue así.

Otro componente de relevancia en la fase móvil es el eluyente polar. Cabe recordar que la histamina es una molécula con propiedades polares y que la función del eluyente es arrastrar los solutos en la fase estacionaria, la cuál es un medio apolar (Snyder & Kirkland, 1974). Y es importante destacar que cada solvente tiene mayor o menor polaridad que variarán los resultados (Barwick, 1997). Se ha reportado que el metanol es un solvente más polar que el acetonitrilo (Dutkiewicz, 1990; Malavolta et al., 2008), por lo que se infiere que el metanol tendría un mayor poder de arrastre de solutos en la fase estacionaria de tal manera que mejoraría la separación para la detección de histamina. Lo anteriormente dicho podría explicar la buena cuantificación de histamina utilizando el metanol como un eluyente polar durante la realización de este trabajo, con lo cuál se puede validar la hipótesis inicial. Incluso es de destacar que los datos de Chen et al. mencionados con anterioridad, usaron el fosfato de sodio como amortiguador y el metanol como solvente polar para la fase móvil, obteniendo buenos resultados (Chen et al., 2016), misma combinación que la del presente trabajo.

A partir de la revisión de antecedentes se esperaba que el OPA a una concentración de 5 mM fuera un derivatizante eficaz para la detección de histamina, lo cual fue verificado con los resultados que reflejaron un alto valor en el coeficiente de correlación en las curvas de calibración; y con ello permitiendo validar la hipótesis inicial. Sin embargo, al no haber diferencias entre OPA 2.5 mM y 5 mM, se podía ahorrar recursos al analizar muestras con la HPLC utilizando OPA al 2.5 mM. Dicha concentración de 2.5 mM de OPA es cercana a otras reportadas en la literatura científica, como el uso de OPA al 2 mM en un detector de FL (Saito et al., 1992), lo cual sugiere que incluso el OPA a una menor concentración a 2.5 mM puede ser efectivo para la detección de histamina. Cabe destacar que en el estudio de Saito et.al., la derivatización fue sobre la columna, esto quiere decir que la fase móvil contenía el derivatizante generando la reacción con histamina en el mismo flujo al ser inyectada. En el presente trabajo, la derivatización se realizó bajo la

modalidad precolumna, la cual consiste en derivatizar la histamina con OPA minutos antes de inyectar la muestra a la fase móvil, por lo que la modalidad de derivatización es un factor importante que se correlaciona con la cantidad de OPA que se requiere para la detección de histamina en la HPLC.

Es de destacar también que en un detector electroquímico para la detección de histamina se utilizó con una mayor concentración de OPA, específicamente 3.8 mM (Jensen & Marley, 1995), lo cual hace sospechar que probablemente la concentración de derivatizante depende también del tipo de detector utilizado en la HPLC.

11.2. Estandarización

Si bien el coeficiente de correlación en las curvas de calibración en el rango de pM fue alto, no se pudo llevar a cabo la comparación con las muestras de stock en fM debido a una falla en el automuestreador que impidió analizar la curva. Cabe decir que estas curvas de calibración se realizaron con mucha separación entre las unidades por lo que el análisis de muestras con intervalos más cercanos pudiera brindar una mejor idea sobre la detección que brinda el equipo de la HPLC sobre la histamina en las condiciones realizadas en este trabajo. En este sentido, se rechazó la hipótesis inicial pues se esperaba que las concentraciones mínimas detectables de histamina fueran en unidades de fM.

11.3. Validación

Si bien se pudo aceptar la hipótesis inicial sobre la cuantificación de histamina en un modelo de rata, tras comparar los resultados con la literatura científica se encontró mucha variedad en las concentraciones basales de histamina. Por un lado, los resultados del presente trabajo entraron en oposición con los datos reportados por Yoshitake et al., pues dicho equipo reportó concentraciones basales de 9.059 ± 1.56 fM por 10 µL de solución extraída de la CPF (Takashi Yoshitake, Yamaguchi, et al., 2003), mientras que el trabajo aquí presentado reflejó resultados en el rango de centenas de pM por cada 25 µL. Otro artículo con datos opuestos a lo reportado en esta tesis reporta un nivel basal de 1.6 nM en promedio de histamina en microdiálisis de CPF de ratas (1,600 pM) (Johnson et al., 2012). Otro estudio en la cuantificación de histamina basal de la CPF obtuvo resultados de 378 ± 36 pM/g de tejido homogeneizado (Brus et al., 2012). La diversidad de

resultados hace pensar en la diversidad de métodos utilizados, pues cada uno de los estudios mencionados con anterioridad fue realizado con diferente método de derivatización e incluso de detector. Ante ello, existe la sospecha de que la comparación de cuantificaciones tiene amplias limitaciones por la diversidad de métodos de cuantificación.

Si bien no se realizó estadística con la cuantificación de histamina en el modelo de rata con dieta azucarada, dado que el grupo control (agua) tuvo un promedio de 96.537 pM y el grupo experimental (azúcar) tuvo un promedio de 211.293 pM, cabe la posibilidad de que al aumentar la *n* se puedan encontrar diferencias entre los grupos. Posiblemente exista una concentración a la alta de histamina en la CPF en ratas con dieta azucarada en comparación con las ratas que consumieron agua. Aunque dicha sospecha resulta inesperada porque se reportó que la administración de soluciones intraorales de sacarosa y sacarina, disminuyó la concentración de histamina en microdiálisis pero no fue de la CPF si no del hipotálamo (Treesukosol et al., 2005). Quizás exista una variabilidad en la cuantificación por especificidad del área cerebral y la periodicidad de la administración de sacarosa, ya que en el estudio de Tresukol et al. encontraron una concentración a la baja pero en un consumo ocasional mientras que la sospecha generada por el presente trabajo sería por un consumo de azúcar a largo plazo.

Con ello en mente y la discusión sobre las sospechas generadas se puede sugerir una posible relación entre la histamina y el consumo de sacarosa a largo plazo, sujeta a ser estudiada posteriormente con el uso del método descrito en el presente trabajo y contrastando con diferentes periodos de administración de sacarosa. Lo anterior deja abiertas muchas posibilidades para la investigación sobre los procesos neuroquímicos, de conductas con componentes adictivos, así como los procesos cognitivos del aprendizaje y memoria de conductas apetitivas y aversivas.

12. CONCLUSIONES

El fosfato de sodio funciona como un amortiguador eficaz para el mantenimiento de la histamina que permite su detección exitosa con la HPLC-FL.

El metanol es un solvente polar eficiente para la separación de histamina en una mezcla analizada con HPLC-FL.

El OPA a una concentración de 2.5 mM es una concentración eficiente para la detección de histamina.

La concentración mínima detectable de histamina por HPLC-FL en nuestro método solo pudo ser analizada en el rango de 1-10 pM. Sin embargo, en las pruebas preliminares se pudo observar que muy probablemente se pueda detectar en rangos de fM.

El método de detección de histamina con OPA/NAC por HPLC-FL es validado en ratas.

13. REFERENCIAS

Arrigoni, E., & Fuller, P. M. (2021). The role of the central histaminergic system in behavioral state control. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, *59*, 447–468. https://doi.org/10.1007/7854_2021_263

Barwick, V. J. (1997). Strategies for solvent selection — a literature review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *16*(6), 293–309. https://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00039-3

Bassetti, C. L., Baumann, C. R., Dauvilliers, Y., Croyal, M., Robert, P., & Schwartz, J. C. (2010). Cerebrospinal fluid histamine levels are decreased in patients with narcolepsy and excessive daytime sleepiness of other origin. *Journal of Sleep Research*, *19*(4), 620–623. https://doi.org/10.1111/J.1365-2869.2010.00819.X

Bourgogne, E., Mathy, F. X., Boucaut, D., Boekens, H., & Laprevote, O. (2012). Simultaneous quantitation of histamine and its major metabolite 1-methylhistamine in brain dialysates by using precolumn derivatization prior to HILIC-MS/MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *402*(1), 449–459. https://doi.org/10.1007/S00216-011-5224-8/FIGURES/6

Brinkman, U. A. T. (1987). A review of reaction detection in HPLC. *Chromatographia*, *24*(1), 190–200. https://doi.org/10.1007/BF02688480/METRICS

Brus, R., Jochem, J., Nowak, P., Adwent, M., Boroń, D., Brus, H., & Kostrzewa, R. M. (2012). Effect of pre- and postnatal manganese exposure on brain histamine content in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, *21*(2), 143–148. https://doi.org/10.1007/S12640-011-9251-1/TABLES/1

Chen, R., Deng, Y., Yang, L., Wang, J., & Xu, F. (2016). Determination of histamine by high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde-sulfite. *Journal of Chromatographic Science*, *54*(4), 547–553. https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv185

Connelly, W. M., Shenton, F. C., Lethbridge, N., Leurs, R., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., Lees, G., & Chazot, P. L. (2009). The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *British Journal of Pharmacology*, *157*(1), 55–63. https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2009.00227.X

Coskun, O. (2016). Separation tecniques: chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, *3*(2), 156. https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757

Croyal, M., Dauvilliers, Y., Labeeuw, O., Capet, M., Schwartz, J. C., & Robert, P. (2010). Histamine and tele-methylhistamine quantification in cerebrospinal fluid from narcoleptic subjects by liquid chromatography tandem mass spectrometry with precolumn derivatization. *Analytical Biochemistry*, *409*(1), 28–36. https://doi.org/10.1016/J.AB.2010.09.045

Dauvilliers, Y., Delalleé, N., Jaussent, I., Scholz, S., Bayard, S., Croyal, M., Schwartz, J. C., & Robert, P. (2012). Normal cerebrospinal fluid histamine and tele-

methylhistamine levels in hypersomnia conditions. *Sleep*, *35*(10), 1359. https://doi.org/10.5665/SLEEP.2114

Dutkiewicz, M. (1990). Classification of organic solvents based on correlation between dielectric β parameter and empirical solvent polarity parameter ENT. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, *86*(12), 2237–2241. https://doi.org/10.1039/FT9908602237

Freifelder, D. (1981). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Reverté. https://www.reverte.com/libro/tecnicas-de-bioquimica-y-biologia-molecular_91479/

Gao, P. F., Guo, X. F., Wang, H., & Zhang, H. S. (2011). Determination of trace biogenic amines with 1,3,5,7-tetramethyl-8-(N-hydroxysuccinimidyl butyric ester)-difluoroboradiaza-s-indacene derivatization using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, *34*(12), 1383–1390. https://doi.org/10.1002/JSSC.201100120

Gika, H., Kaklamanos, G., Manesiotis, P., & Theodoridis, G. (2015). Chromatography: high-performance liquid chromatography. *Encyclopedia of Food and Health*, 93–99. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00159-8

Haas, H. L., Sergeeva, O. A., & Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. In *Physiological Reviews* (Vol. 88, Issue 3, pp. 1183–1241). American Physiological Society. https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2007

Harrison, J., LaFleur, K., Mantone, D., Boisette, B., Harris, A., Catapane, E. J., & Carroll, M. A. (2015). The presence of histamine and a histamine receptor in the bivalve mollusc, Crassostrea virginica. *In Vivo*, *36*(3), 123. /pmc/articles/PMC4480605/

Hasanein, P. (2011). Two histamine H2 receptor antagonists, zolantidine and cimetidine, modulate nociception in cholestatic rats. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, *25*(2), 280–286. https://doi.org/10.1177/0269881109106912

Hegstrand, L. R., & Hine, R. J. (1986). Variations of brain histamine levels in germ-free and nephrectomized rats. *Neurochemical Research*, *11*(2), 185–191. https://doi.org/10.1007/BF00967967/METRICS

Histamine | C5H9N3 - PubChem. (n.d.). Retrieved August 12, 2022, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Histamine#section=Depositor-Supplied-Synonyms

Hogan, A. M., Crean, C., Barrett, U. M., Guihen, E., & Glennon, J. D. (2012). Histamine determination in human urine using sub-2 µm C18 column with fluorescence and mass spectrometric detection. *Journal of Separation Science*, *35*(9), 1087–1093. https://doi.org/10.1002/JSSC.201101045

Hsieh, Y. H., Lee, M. Y., & Wu, C. C. (2018). An electrooxidative technique to fast fabricate copper phosphate electrodes capable of integrating high performance liquid chromatography for the label-free detection of fish freshness. *Food Chemistry*, *269*, 16–23. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.06.125

Itoh, Y., Oishi, R., Adachi, N., & Saeki, K. (1992). A highly sensitive assay for histamine

using ion-pair HPLC coupled with postcolumn fluorescent derivatization: its application to biological specimens. *Journal of Neurochemistry*, *58*(3), 884–889. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1992.TB09339.X

Jensen, T. B., & Marley, P. D. (1995). Development of an assay for histamine using automated high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications*, *670*(2), 199–207. https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00131-X

Johnson, D. E., Drummond, E., Grimwood, S., Sawant-Basak, A., Miller, E., Tseng, E., McDowell, L. L., Vanase-Frawley, M. A., Fisher, K. E., Rubitski, D. M., Stutzman-Engwall, K. J., Nelson, R. T., Horner, W. E., Gorczyca, R. R., Hajos, M., & Siok, C. J. (2012). The 5-hydroxytryptamine4 receptor agonists prucalopride and prx-03140 increase acetylcholine and histamine levels in the rat prefrontal cortex and the power of stimulated hippocampal θ oscillations. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *341*(3), 681–691. https://doi.org/10.1124/JPET.112.192351

Jośko, J., Drab, J., Jochem, J., Nowak, P., Szkilnik, R., Korossy-Mruk, E., Boron, D., Kostrzewa, R. M., Brus, H., & Brus, R. (2011). Ontogenetic serotoninergic lesioning alters histaminergic activity in rats in adulthood. *Neurotoxicity Research*, *20*(2), 103–108. https://doi.org/10.1007/S12640-010-9217-8/FIGURES/1

Kanbayashi, T., Kodama, T., Kondo, H., Satoh, S., Inoue, Y., Chiba, S., Shimizu, T., & Nishino, S. (2009). CSF histamine contents in narcolepsy, idiopathic hypersomnia and obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep*, *32*(2), 181. https://doi.org/10.1093/SLEEP/32.2.181

Kawanishi, H., Toyo'oka, T., Ito, K., Maeda, M., Hamada, T., Fukushima, T., Kato, M., & Inagaki, S. (2006). Rapid determination of histamine and its metabolites in mice hair by ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, *1132*(1–2), 148–156. https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2006.07.086

Kawanishi, H., Toyo'oka, T., Ito, K., Maeda, M., Hamada, T., Fukushima, T., Kato, M., & Inagaki, S. (2007). Hair analysis of histamine and several metabolites in C3H/HeNCrj mice by ultra performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-TOF-MS): influence of hair cycle and age. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *378*(1–2), 122–127. https://doi.org/10.1016/J.CCA.2006.11.007

Kehr, J., & Yoshitake, T. (2013). Determination of histamine in microdialysis samples from the rodent brain by column liquid chromatography. *Neuromethods*, *75*, 299–320. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-173-8_15

Kirschbaum, J., Luckas, B., & Beinert, W. D. (1994). Pre-column derivatization of biogenic amines and amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and heptylamine. *Journal of Chromatography A*, *661*(1–2), 193–199. https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)E1107-B

Kiviranta, T., Tuomisto, L., & Airaksinen, E. M. (1995). Histamine in cerebrospinal fluid of

children with febrile convulsions. *Epilepsia*, *36*(3), 276–280. https://doi.org/10.1111/J.1528-1157.1995.TB00996.X

Kodchakorn, K., Nimmanpipug, P., Phongtamrug, S., & Tashiro, K. (2019). pH-induced conformational changes in histamine in the solid state. *RSC Advances*, *9*(34), 19375–19389. https://doi.org/10.1039/C9RA03418H

Kounnoun, A., EL Maadoudi, M., Cacciola, F., Mondello, L., Bougtaib, H., Alahlah, N., Amajoud, N., EL Baaboua, A., & Louajri, A. (2020). Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of histamine in fish samples using fluorescence detection with pre-column derivatization. *Chromatographia*, *83*(7), 893–901. https://doi.org/10.1007/S10337-020-03909-9/TABLES/4

Koyama, J., Takeuchi, A., Morita, I., Nishino, Y., Shimizu, M., Inoue, M., & Kobayashi, N. (2009). Characterization of emodin metabolites in Raji cells by LC–APCI-MS/MS. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *17*(21), 7493–7499. https://doi.org/10.1016/J.BMC.2009.09.024

Kuruma, K., & Sakano, T. (1999). Highly sensitive determination of histamine by narrow-bore high- performance liquid chromatography using postcolumn fluorescence detection. *Analytical Sciences*, *15*(5), 489–492. https://doi.org/10.2116/ANALSCI.15.489/METRICS

Larionova, D. A., Shtykov, S. N., Beloglazova, N. V., & Koroleva, E. N. (2008). Effect of nucleophilic agents and organized media on the fluorimetric determination of histamine with o-phthalic aldehyde. *Journal of Analytical Chemistry*, *63*(11), 1044–1050. https://doi.org/10.1134/S1061934808110051/METRICS

Leenaars, C. H. C., Pim Drinkenburg, W. H., Nolten, C., Dematteis, M., Joosten, R. N. J. M. A., Feenstra, M. G. P., & De Vries, R. B. M. (2019). Sleep and microdialysis: an experiment and a systematic review of histamine and several amino acids. *Journal of Circadian Rhythms*, *17*(1), 1–12. https://doi.org/10.5334/JCR.183

Levick, S. P. (2021). *Histamine receptors in heart failure*. *27*(4), 1355–1372. https://link.springer.com/article/10.1007/s10741-021-10166-x

Lewis, J. A., Lommen, D. C., Raddatz, W. D., Dolan, J. W., Snyder, L. R., & Molnar, I. (1992). Computer simulation for the prediction of separation as a function of pH for reversed-phase high-performance liquid chromatography. I. Accuracy of a theory-based model. *Journal of Chromatography*, *592*(1–2), 183–195. https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85085-8

Locatelli, M., Melucci, D., Carlucci, G., & Locatelli, C. (2012). Recent HPLC strategies to improve sensitivity and selectivity for the analysis of complex matrices. In *Instrumentation Science and Technology* (Vol. 40, Issues 2–3, pp. 112–137). Taylor & Francis Group. https://doi.org/10.1080/10739149.2011.651668

Lozeva, V., MacDonald, E., Belcheva, A., Hippeläinen, M., Kosunen, H., & Tuomisto, L. (1998). Long-term effects of portacaval anastomosis on the 5-hydroxytryptamine, histamine, and catecholamine neurotransmitter systems in rat brain. *Journal of*

Neurochemistry, *71*(4), 1450–1456. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71041450.x

Lozeva, Violina, Montgomery, J. A., Tuomisto, L., Rocheleau, B., Pannunzio, M., Huet, P. M., & Butterworth, R. F. (2004). Increased brain serotonin turnover correlates with the degree of shunting and hyperammonemia in rats following variable portal vein stenosis. *Journal of Hepatology*, *40*(5), 742–748. https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2004.01.003

Maintz, L., & Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(5), 1185–1196. https://doi.org/10.1093/AJCN/85.5.1185

Majors, R. E. (2015). Historical developments in HPLC and UHPLC column technology: The past 25 years. *LC-GC North America*, *33*(11), 818–840. https://eds-p-ebscohost-com.pbidi.unam.mx:2443/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=6&sid=a3ea3907-73c4-43b4-919b-04236d5e882c%40redis

Malavolta, L., Poletti, E. F., Silva, E. H., Schreier, S., & Nakaie, C. R. (2008). Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy for validation of the novel (AN+DN) solvent polarity scale. *International Journal of Molecular Sciences*, *9*(7), 1321–1332. https://doi.org/10.3390/ijms9071321

Maldonado, M., & Maeyama, K. (2013a). Simultaneous electrochemical measurement method of histamine and N(τ)-methylhistamine by high-performance liquid chromatography-amperometry with o-phthalaldehyde-sodium sulfite derivatization. *Analytical Biochemistry*, *432*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/J.AB.2012.09.022

Maldonado, M., & Maeyama, K. (2013b). Simultaneous electrochemical measurement method of histamine and Nτ-methylhistamine by high-performance liquid chromatography–amperometry with o-phthalaldehyde–sodium sulfite derivatization. *Analytical Biochemistry*, *432*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/J.AB.2012.09.022

Miyamoto, Y., Yoshimoto, R., Yumoto, M., Ishihara, A., Takahashi, K., Kotani, H., Kanatani, A., & Tokita, S. (2004). Simultaneous fluorometric measurement of histamine and tele-methylhistamine levels in rodent brain by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, *334*(1), 89–96. https://doi.org/10.1016/J.AB.2004.07.016

Moitessier, C., Kital, K., Danjou, P. E., & Cazier-Dennin, F. (2020). 4-Methoxy-ortho-phthalaldehyde: a promising derivatizing agent for the fluorimetric evaluation of histamine in seafood. *Talanta Open*, *2*, 100014. https://doi.org/10.1016/J.TALO.2020.100014

Nieto-Alamilla, G., Márquez-Gómez, R., García-Gálvez, A. M., Morales-Figueroa, G. E., & Arias-Montaño, J. A. (2016). The histamine H3 receptor: Structure, pharmacology, and function. In *Molecular Pharmacology* (Vol. 90, Issue 5, pp. 649–673). American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. https://doi.org/10.1124/mol.116.104752

Nishino, S., Sakurai, E., Nevsimalova, S., Yoshida, Y., Watanabe, T., Yanai, K., & Mignot,

E. (2009). Decreased CSF histamine in narcolepsy with and without low CSF hypocretin-1 in comparison to healthy controls. *Sleep*, *32*(2), 175–180. https://doi.org/10.1093/sleep/32.2.175

Nomura, H., Mizuta, H., Norimoto, H., Masuda, F., Miura, Y., Kubo, A., Kojima, H., Ashizuka, A., Matsukawa, N., Baraki, Z., Hitora-Imamura, N., Nakayama, D., Ishikawa, T., Okada, M., Orita, K., Saito, R., Yamauchi, N., Sano, Y., Kusuhara, H., … Ikegaya, Y. (2019). Central histamine boosts perirhinal cortex activity and restores forgotten object memories. *Biological Psychiatry*, *86*(3), 230–239. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.11.009

Passani, M. B., Benetti, F., Blandina, P., Furini, C. R. G., de Carvalho Myskiw, J., & Izquierdo, I. (2017). Histamine regulates memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *145*, 1–6. https://doi.org/10.1016/J.NLM.2017.08.007

Peng, J. feng, Fang, K. teng, Xie, D. hua, Ding, B., Yin, J. Y., Cui, X. mei, Zhang, Y., & Liu, J. fu. (2008). Development of an automated on-line pre-column derivatization procedure for sensitive determination of histamine in food with high-performance liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, *1209*(1–2), 70–75. https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2008.09.028

Perdan-Pirkmajer, K., Mavri, J., & Krẑan, M. (2010). Histamine (re)uptake by astrocytes: an experimental and computational study. *Journal of Molecular Modeling*, *16*(6), 1151–1158. https://doi.org/10.1007/S00894-009-0624-9

Poole, C.F. (2000). Chromatography. *Encyclopedia of Separation Science*, 40–64. https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/00021-1

Poole, Colin F. (2003). *The Essence of chromatography*. Elsevier Science Ltd. http://www.sciencedirect.com:5070/book/9780444501981/the-essence-of-chromatography?via=ihub=

Previati, M., Raspadori, A., Bertolaso, L., Parmeggiani, A., Bindini, D., Vitali, C., Lanzoni, I., Corbacella, E., Saviano, M., Fagioli, F., Blo, G., & Capitani, S. (2002). Determination of histamine in the whole blood of colon cancer patients. *Journal of Chromatography B*, *780*(2), 331–339. https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00541-X

Purón-Sierra, L., & Miranda, M. I. (2014). Histaminergic modulation of cholinergic release from the nucleus basalis magnocellularis into insular cortex during taste aversive memory formation. *PLoS ONE*, *9*(3), e91120. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091120

Purón-Sierra, L., Sabath, E., Nuñez-Jaramillo, L., & Miranda, M. I. (2010). Blockade of nucleus basalis magnocellularis or activation of insular cortex histamine receptors disrupts formation but not retrieval of aversive taste memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *93*(2), 216–220. https://doi.org/10.1016/J.NLM.2009.10.001

Ramos, R. M., Brandão, P. F., & Rodrigues, J. A. (2020). Development of a SALLE-HPLC-FLD analytical method for the simultaneous determination of ten biogenic amines in cheese. *Food Analytical Methods*, *13*(5), 1088–1098. https://doi.org/10.1007/s12161-

020-01730-6

Rinne, J. O., Anichtchik, O. V., Eriksson, K. S., Kaslin, J., Tuomisto, L., Kalimo, H., Röyttä, M., & Panula, P. (2002). Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy. *Journal of Neurochemistry*, *81*(5), 954–960. https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2002.00871.X

Roca Salom, P., Oliver Oliver, J., & Rodríguez Guerrero, A. M. (2003). *Bioquímica técnicas y métodos*. Hélice. https://books.google.es/books/about/Bioquímica.html?hl=es&id=yZSsoYt_mbMC&pgis=1

Roth, M. (1971). Fluorescence reaction for amino acids. *Analytical Chemistry*, *43*(7), 880–882. https://doi.org/10.1021/ac60302a020

Saito, K., Horif, M., Nose, N., Nakagomi, K., & Nakazawa, H. (1992). Determination of polyamines in foods by liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. *Analytical Sciences*, *8*(5), 675–680. https://doi.org/10.2116/analsci.8.675

Snyder, L. R., & Kirkland, J. J. (1974). *Introduction to modern liquid chromatography: Vol. (I-XVIII+5* (Third edit). John Wiley & Son. https://doi.org/10.1093/jaoac/58.1.169

Soya, A., Song, Y. H., Kodama, T., Honda, Y., Fujiki, N., & Nishino, S. (2007). CSF histamine levels in rats reflect the central histamine neurotransmission. *Neuroscience Letters*, *430*(3), 224–229. https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2007.11.002

Swartz, M. (2010). HPLC detectors: a brief review. *Https://Doi.Org/10.1080/10826076.2010.484356*, *33*(9–12), 1130–1150. https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356

Takayuki Masaki, & Hironobu Yoshimatsu. (2007). Neuronal histamine and its receptors in obesity and diabetes. *Current Diabetes Reviews*, *3*(3), 212–216. https://doi.org/10.2174/157339907781369002

Tanio, M., Nakamura, T., Kusunoki, H., Ideguchi, K., Nakashima, K., & Hamaguchi, I. (2020). Validation of HPLC method for determination of histamine in human immunoglobulin formulations. *Journal of AOAC International*, *103*(5), 1223–1229. https://doi.org/10.1093/JAOACINT/QSAA017

Treesukosol, Y., Ishizuka, T., Yamamoto, C., Senda, K., Tsutsumi, S., Yamatodani, A., & Yamamoto, T. (2005). Hypothalamic histamine release by taste stimuli in freely moving rats: possible implication of palatability. *Behavioural Brain Research*, *164*(1), 67–72. https://doi.org/10.1016/J.BBR.2005.06.004

Tsiasioti, A., & Tzanavaras, P. D. (2021). Selective post-column derivatization coupled to cation exchange chromatography for the determination of histamine and its precursor histidine in fish and Oriental sauce samples. *Food Chemistry*, *351*, 129351. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.129351

Valle-Dorado, M. G., Santana-Gómez, C. E., Orozco-Suárez, S. A., & Rocha, L. (2015). The mast cell stabilizer sodium cromoglycate reduces histamine release and status

epilepticus-induced neuronal damage in the rat hippocampus. *Neuropharmacology*, *92*, 49–55. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2014.12.032

Verma, S. P., & Santoyo, E. (2007). High-performance liquid and ion chromatography: Separation and quantification analytical techniques for rare earth elements. *Geostandards and Geoanalytical Research*, *31*(3), 161–184. https://doi.org/10.1111/J.1751-908X.2007.00842.X

Wellings, D. A. (2005). *A practical handbook of preparative HPLC*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-1-85617-466-4.X5000-2

Yamatodani, A., Fukuda, H., Wada, H., Iwaeda, T., & Watanabe, T. (1985). High-performance liquid chromatographic determination of plasma and brain histamine without previous purification of biological samples: cation-exchange chromatography coupled with post-column derivatization fluorometry. *Journal of Chromatography*, *344*(C), 115–123. https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)82012-5

Yoshikawa, T., Nakamura, T., & Yanai, K. (2019). Histamine N-methyltransferase in the brain. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 737*, *20*(3), 737. https://doi.org/10.3390/IJMS20030737

Yoshimatsu, H., Chiba, S., Tajima, D., Akehi, Y., & Sakata, T. (2002). Histidine suppresses food intake through its conversion into neuronal histamine. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *227*(1), 63–68. https://doi.org/10.1177/153537020222700111

Yoshitake, T., Ijiri, S., Yoshitake, S., Todoroki, K., Yoshida, H., Kehr, J., Nohta, H., & Yamaguchi, M. (2012). Determination of histamine in microdialysis samples from Guinea pig skin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Skin Pharmacology and Physiology*, *25*(2), 65–72. https://doi.org/10.1159/000330899

Yoshitake, Takashi, Ichinose, F., Yoshida, H., Todoroki, K. I., Kehr, J., Inoue, O., Nohta, H., & Yamaguchi, M. (2003). A sensitive and selective determination method of histamine by HPLC with intramolecular excimer-forming derivatization and fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, *17*(8), 509–516. https://doi.org/10.1002/BMC.264

Yoshitake, Takashi, Yamaguchi, M., Nohta, H., Ichinose, F., Yoshida, H., Yoshitake, S., Fuxe, K., & Kehr, J. (2003). Determination of histamine in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography following intramolecular excimer-forming derivatization with pyrene-labeling reagent. *Journal of Neuroscience Methods*, *127*(1), 11–17. https://doi.org/10.1016/S0165-0270(03)00097-9

Yuri V. Kazakevich, R. L. (2007). *HPLC for pharmaceutical scientists*. John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/0470087951

Zandy, S. L., Doherty, J. M., Wibisono, N. D., & Gonzales, R. A. (2017). High sensitivity HPLC method for analysis of in vivo extracellular GABA using optimized fluorescence parameters for o-phthalaldehyde (OPA)/sulfite derivatives. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*,

1055–1056, 1. https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2017.04.003

Zeitzer, J. M., Kodama, T., Buckmaster, C. L., Honda, Y., Lyons, D. M., Nishino, S., & Mignot, E. (2012). Time-course of cerebrospinal fluid histamine in the wake-consolidated squirrel monkey. *Journal of Sleep Research*, *21*(2), 189–194. https://doi.org/10.1111/J.1365-2869.2011.00957.X

Zhang, Y., Tingley, F. D., Tseng, E., Tella, M., Yang, X., Groeber, E., Liu, J., Li, W., Schmidt, C. J., & Steenwyk, R. (2011). Development and validation of a sample stabilization strategy and a UPLC-MS/MS method for the simultaneous quantitation of acetylcholine (ACh), histamine (HA), and its metabolites in rat cerebrospinal fluid (CSF). *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *879*(22), 2023–2033. https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2011.05.030