

N.º 20
Z.L.S.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

EVALUACION DE LA NEUROTOXICIDAD
DEL PLOMO EN EL SISTEMA
SEROTONERGICO DE LA RATA

T E S I S
Que para obtener el Título de
Químico Farmacéutico Biólogo
p r e s e n t a

GISELA CAHERO LIMON

México, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

2.- SEROTONINA.	21
2.1.- BIOSINTESIS.	21
2.2.- CATABOLISMO.	23
2.3.- EFECTOS CELULARES DE LA SEROTONINA.	23
2.4.- SINDROME SEROTONINERGOICO.	24
C.- TECNICAS ANALITICAS.	27
1.- CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.	27
1.1.- GENERALIDADES.	27
1.2.- DEFINICIONES Y ECUACIONES BASICAS.	28
1.3.- SISTEMA CROMATOGRAFICO.	31
1.4.- DETECTOR ELECTROQUIMICO.	37
1.5.- TECNICA DE PAR IONICO.	39
1.6.- ANALISIS DE MONOAMINAS.	43
2.- VOLTAMPEROMETRIA ANODICA DE REDISOLUCION.	46
2.1.- GENERALIDADES.	46
2.2.- DEFINICIONES Y ECUACIONES BASICAS.	46
2.3.- CELDA DE TRABAJO.	50
2.4.- PRINCIPIO DE OPERACION.	51
III.- PARTE EXPERIMENTAL.	52
1.- MATERIALES Y REACTIVOS.	52
1.1.- PREPARACION DE LOS REACTIVOS.	52
1.2.- PREPARACION DE LOS ESTANDARES.	53
1.3.- REACTIVOS METEXCHANGE (ESA).	54
1.4.- MATERIAL BIOLÓGICO.	54
1.5.- LAVADO DE MATERIAL.	54

2.- ADMINISTRACION DEL PLOMO.	55
3.- OBTENCION DEL TEJIDO.	55
4.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS.	55
4.1.- PARA LA DETERMINACION DE MONOAMINAS Y METABOLITOS.	
4.2.- PARA LA DETERMINACION DE PLOMO.	56
5.- ANALISIS.	56
5.1.- CUANTIFICACION DE MONOAMINAS Y METABOLITOS POR	
HPLC.	56
a) Condiciones Normales de Operacion.	56
b) Procedimiento.	56
5.2.- CUANTIFICACION DE PLOMO EN SANGRE.	57
a) Condiciones Normales de Operacion.	57
b) Procedimiento.	57
6.- ESTUDIO CONDUCTUAL.	58
IV.- RESULTADOS.	60
V.- DISCUSION DE RESULTADOS.	77
VI.- CONCLUSIONES.	78
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	79

I.- INTRODUCCION.

Los metales pesados son los venenos más antiguos conocidos por el hombre, su sitio de acción principal es el Sistema Nervioso, razón por la cual el estudio de los efectos producidos por los metales, en particular el plomo en el ser humano, ha tomado gran importancia en esta época en la que los niveles ambientales de este metal son elevados.

Gracias al uso de técnicas analíticas altamente sensibles, pueden determinarse los cambios en las concentraciones de compuestos químicos, que se encuentran en bajas cantidades en el cerebro, y que resultan afectados por la intoxicación con metales pesados.

En el presente trabajo se investigó como afecta la ingestión subaguda de plomo por vía oral, a los sistemas monoaminérgicos centrales en ocho regiones del cerebro de ratas adultas, haciendo referencia particular al sistema de la serotonina, que es el menos estudiado, y que demostró ser el más sensible a los efectos tóxicos del plomo.

En este trabajo se evaluaron las concentraciones de monoaminas y sus metabolitos en distintos grupos de animales expuestos y no expuestos al metal y también se evaluaron los cambios conductuales mediados por serotonina utilizando el compuesto p-cloroamfetamina, un serotonomimético, con el fin de buscar algún posible efecto del plomo sobre la fisiología normal de la transmisión serotoninérgica.

Se observaron cambios significativos en las concentraciones de serotonina (5-HT) y Acido 5-hidroxiindolilacético (5-HIAA), en

animales expuestos a plomo, en comparacion con los no expuestos.

Las regiones más afectadas fueron hipocampo y cuerpo estriado, en donde se observó también un cambio significativo en los niveles de plomo en sangre, como resultado de la exposición.

De la misma manera se observaron diferencias significativas en las conductas que componen el síndrome serotoninérgico inducido por p-cloroamfetamina, lo que indica una relación directa entre la función serotoninérgica central y el aumento en la concentración sanguínea de plomo.

II.- ANTECEDENTES.

A.- PLOMO.

1.- GENERALIDADES.

El hombre siempre ha estado expuesto a los metales pesados que tienen de manera natural concentraciones en suelo y agua. En áreas donde existen grandes depósitos, la contaminación metálica del alimento y el agua produjo probablemente los primeros envenenamientos.

El advenimiento de la era industrial y de la minería a gran escala trajo consigo enfermedades ocupacionales causadas por exposición a diversos metales tóxicos, el uso de plaguicidas y agentes terapéuticos con constituyentes metálicos fueron fuentes adicionales de exposición riesgosa.

La combustión de fósiles que contienen metales pesados y la adición de tetraetilo de plomo a la gasolina ha hecho hoy que la contaminación ambiental sea la mayor fuente de exposición a plomo y otros metales pesados.

El sitio de acción principal de los metales es el Sistema Nervioso, razón por la cual el estudio de los efectos producidos por el plomo en el ser humano ha tomado gran importancia en esta época en la que los niveles ambientales de plomo son elevados.

Estudios recientes en la ciudad de México muestran que la concentración promedio de plomo en sangre es de 18.8 µg/dL. (Claeys-Thoreau y col., 1987), en adultos sin antecedentes de exposición laboral a plomo, resultados que son mayores a los reportados en otros países como normales.

Debido a lo anterior, se han desarrollado modelos de exposici6n en animales, y dependiendo de la finalidad del estudio, se han utilizado ratas, ratones y monos a los que se ha tratado en diferentes etapas de su desarrollo y a los que se ha administrado el t6xico en agua o comida, exhibiendo incrementos significativos en la actividad motora, pobre aprendizaje, etc. (Tsung-Ming Shih, 1978).

En el humano, la exposici6n a plomo aun en niveles no t6xicos, produce d6ficit en la inteligencia, pobre aprovechamiento acad6mico, hiperactividad y deficiencias en el control motor fino, adem6s de baja estatura y p6rdida de peso. (Markovac y col., 1988)

El plomo org6nico se absorbe por piel, no as6 el inorg6nico que se absorbe por v6a gastrointestinal, cuyas c6lulas epiteliales son incapaces de impedir la absorpci6n de cationes polivalentes, aun cuando solo se absorbe del 8 al 12 % del plomo ingerido por adultos (Walsh y col.,1986), y cerca del 40 % del plomo diet6tico en ni6os.

Se ha propuesto que el plomo y el calcio pueden competir por un mecanismo com6n de transporte, por lo que existe una relaci6n rec6proca entre el contenido diet6tico del calcio y la absorpci6n del plomo.

Despu6s de su absorpci6n, el plomo inorg6nico se distribuye inicialmente en los tejidos blandos, especialmente en el epitelio tubular del ri6n y en el h6gado, para redistribuirse posteriormente en huesos, dientes y pelo. Cerca del 95 % de la carga corporal del metal se encuentra concentrada en hueso. Casi todo el plomo inorg6nico circulante se asocia a los eritrocitos,

unicamente cuando el plomo esta presente en concentraciones relativamente altas queda una porcion significativa en plasma.

En el adulto el plomo inorganico no alcanza niveles elevados en cerebro, a pesar de lo cual su accion toxica es a nivel de Sistema Nervioso Central (Stewart, 1975), posiblemente debido a una mayor sensibilidad de este sistema a la accion del metal.

2.-MECANISMO DE ACCION DEL PLOMO.

Se conoce que el plomo modifica la tasa de sintesis del grupo hemo, inhibiendo las enzimas dehidratasa del acido delta-aminolevulinico (δ -ALA) y ferroquelatasa.

La perdida de la actividad de estas enzimas puede a su vez afectar la funcion mitocondrial, produciendo efectos adversos en el metabolismo energetico (Silbergeld y Lanon, 1980). Las celulas endoteliales de la barrera hemato-encefalica son especialmente ricas en mitocondrias por lo que son susceptibles a la intoxicacion por plomo. (Sundstrom y col., 1985)

El plomo puede afectar la neurotransmision en el cerebro por interferencia sobre los neurotransmisores, de hecho, el δ -ALA (producido en gran cantidad como resultado de la accion del plomo sobre la sintesis del grupo hemo) tiene estructura quimica similar al GABA, por lo que la competencia de la δ -ALA con este neurotransmisor se propone como uno de los mecanismos de accion del metal. (Brenan y Cantwill, 1979)

El plomo tambien afecta el metabolismo y transporte de calcio. Se ha demostrado que la presencia de plomo impide la entrada de calcio a la celula debido a una inhibicion competitiva, bloqueando por ende la liberacion del neurotransmisor que

depende de la entrada de Iones Ca^{2+} . (Aungst y Lung, 1985)

3.-EFECTOS GENERALES DEL PLOMO SOBRE LA BIOQUIMICA CEREBRAL.

Se ha encontrado que en animales cuyas madres fueron tratadas con plomo hasta el destete, hay retraso en el crecimiento posnatal y reducci3n del peso cerebral y cerebelar.

En el cerebelo se encuentra incrementada la concentraci3n de agua y disminuci3n en el contenido de DNA, indicando intenso edema y posible destrucci3n neuronal. (Patel y col., 1974)

Tambi3n se afectan las reacciones de transaminaci3n, reflejandose en la reducci3n de la utilizaci3n de glucosa, que decremente la conversi3n de acetato a amino3cidos, concordando esto con una depresi3n de la actividad del ciclo de Krebs. (Patel y col., 1974)

El plomo afecta la respiraci3n mitocondrial ya que actua como desacoplante de enzimas, disminuyendo la eficiencia de estas. (Sundstrom y col.,1985)

Otros efectos bioquimicos incluyen cambios en la composici3n lipidica (Stephens y Gerber, 1981), disrupci3n en el metabolismo de citocromos (Bull y col.,1979), etc.

4.- EFECTOS DEL PLOMO EN LA NEUROQUIMICA CEREBRAL.

a) SISTEMA COLINERGICO.

El plomo reemplaza competitivamente al calcio en los sitios presin3pticos de las c3lulas colin3rgicas afectando la liberaci3n de Acetilcolina y la recaptura de colina. (Ramsay y col., 1980)

b) SISTEMA GABAERGICO.

Se ha observado inhibición en la recaptura y liberación del GABA en todas las zonas cerebrales, exceptuando el cerebelo, en el cual están disminuidos los niveles de GABA. (Ramsay y col., 1980)

Hay cambios significativos en la actividad enzimática, por ejemplo: Disminuye la actividad de la GABA transaminasa en la corteza; Incremento de la descarboxilasa del Acido glutámico en Substantia nigra; también se ve aumentada la velocidad aparente de síntesis de GABA. (Silbergeld y col., 1979)

c) SISTEMAS MONOAMINERGICOS.

1.- IN VITRO.

La actividad de tirosina hidroxilasa no se afecta aún a concentraciones de 1 mM de plomo en hipotálamo y cuerpo estriado.

El plomo bloquea la recaptura y liberación de dopamina en los sinaptosomas y la actividad de adenilato ciclasa a concentraciones menores a 3 μ M. (Komulainen y col., 1983)

2.- IN VIVO.

Se observa una reducción significativa en la actividad de tirosina hidroxilasa en el hipotálamo. (Meredith y col., 1988)

Hay reducción significativa en las concentraciones de triptofano y Acido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipocampo. (Lasley y col., 1984)

B.- FISIOLÓGIA DE LAS MONOAMINAS.

1.- CATECOLAMINAS.

Se denomina catecolamina a todos los compuestos orgánicos que contienen un grupo catecol (un anillo bencénico con dos sustituyentes hidroxilo adyacentes) y un grupo amino. Este término implica a la dihidroxifeniletilamina (Dopamina, DA) y sus productos metabólicos, la Noradrenalina (NA) y la Adrenalina (A).

El cuerpo celular de una neurona central tiene concentraciones relativamente bajas de aminas (10-100 $\mu\text{g/g}$), en tanto que las varicosidades terminales contienen una muy alta concentración (1-3 mg/g). Los axones consisten de fibras ramificadas y casi desmielinizadas que tienen tan baja concentración de aminas que son apenas visibles en animales adultos. Al microscopio electrónico es posible observar la presencia de vesículas granulares que representan los sitios de almacenamiento subcelular de catecolaminas.

Las catecolaminas tienen una acción periférica bien establecida con respecto al stress y a la conducta emocional, muchos estudios farmacológicos parecen implicar a las catecolaminas como las aminas que intervienen en los trastornos afectivos. Una hipótesis señala que la depresión en el comportamiento puede relacionarse con una deficiencia de catecolaminas en receptores adrenérgicos centrales, en tanto que la manía se debe a un exceso de catecolaminas (DA y NA).

1.1.- BIOSINTESIS.

Las catecolaminas son producidas por el cerebro, células cromafines, nervios simpáticos, y ganglios simpáticos a partir de su aminoácido precursor, la Tirosina.

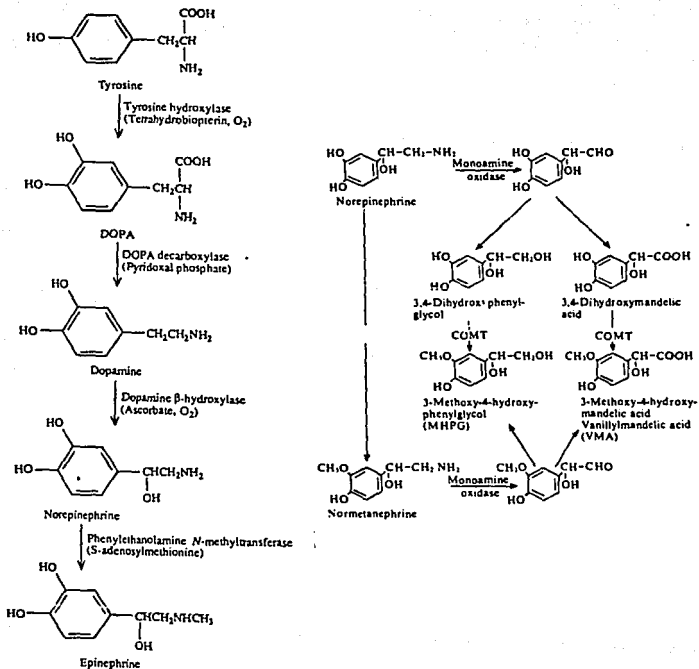
La enzima tirosina-hidroxilasa interviene en la transformación de L-tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). (Ver Esquema No.1) La tirosina es captada del torrente sanguíneo y concentrada dentro del cerebro y en otros tejidos inervados por el sistema simpático, por medio de un mecanismo de transporte activo. Una vez dentro de la neurona periférica, la tirosina sufre una serie de transformaciones químicas cuyos productos finales en el cerebro son noradrenalina, dopamina o adrenalina, dependiendo de la disponibilidad de la feniletanolamina-N-metiltransferasa y de la dopamina- β -hidroxilasa.

En los mamíferos, la tirosina puede derivarse de la fenilalanina de la dieta por medio de la fenilalanina hidroxilasa que se encuentra principalmente en el hígado. La biosíntesis de noradrenalina comienza con la tirosina, lo que representa un punto de ramificación para muchos procesos biosintéticos importantes en los tejidos animales.

1.2.- REGULACION DE LA SINTESIS.

Al establecerse que el paso limitante de la tasa de conversión de tirosina a noradrenalina está establecido por la tirosina-hidroxilasa, pudo demostrarse experimentalmente que los inhibidores del paso inicial reducen eficazmente las concentraciones de noradrenalina y dopamina. Se sabe que el grado de actividad simpática no influye en los niveles endógenos de la noradrenalina.

ESQUEMA No. 1



BIOSINTESIS Y METABOLISMO DE MONOAMINAS.

tisular, y se especula la presencia de algun mecanismo homeostático por el cual en las terminaciones nerviosas simpáticas se mantiene un nivel relativamente constante del neurotransmisor a pesar de las pbrdidas que implica la accibn nerviosa simpática inducida.

Durante los periodos de actividad funcional elevada, las neuronas simpáticas tambien aumentan la síntesis de noradrenalina para cubrir la demanda en la neurona. Al aumentar la síntesis de neurotransmisor se mantiene constante la concentracibn del mismo a. pesar de los cambios en la utilizacibn de este. Un aumento en la concentracibn de noradrenalina endbgena en los tejidos periféricos inervados por el sistema simpático o de la concentracibn de catecolaminas en el cerebro, producidas por el tratamiento con inhibidores de la monoaminooxidasa (MAO), produce una notable reduccibn de la biosíntesis de catecolaminas.

Durante los periodos de intensificado flujo de impulsos en los cuales se libera y metaboliza más neurotransmisor, se agota la reserva de regulacibn de noradrenalina estratégica normalmente accesible a la tirosina-hidroxilasa, se eliminan los productos finales de inhibicibn y aumenta la actividad de la tirosina-hidroxilasa. Durante los periodos de latencia, cuando disminuye la utilizacibn del neurotransmisor, la noradrenalina se acumula y la actividad de la tirosina-hidroxilasa disminuye.

La liberacibn de tirosina-hidroxilasa por una inhibicibn retroactiva es un mecanismo operativo de la neurona simpática y de las neuronas centrales de catecolamina para aumentar la síntesis del neurotransmisor como respuosta al flujo de impulsos intensificado. La disminucibn de la afinidad de la tirosina-

hidroxilasa por la catecolamina puede ser fisiológicamente importante para la regulación de la síntesis del neurotransmisor.

Un mecanismo de corta duración, además de la disminución de catecolaminas endógenas, altera la actividad de la tirosina-hidroxilasa durante el aumento de la actividad neuronal.

1.3.- RECAMBIO.

Recambio connota la tasa global a la cual toda la amina almacenada es reemplazada en un determinado tejido. La evaluación de la tasa de recambio puede utilizarse como índice del estado funcional de varias poblaciones de neuronas simpáticas, pero no como un índice de la capacidad sintética de las neuronas.

El recambio y la síntesis de las monoaminas cerebrales son más rápidos que en los tejidos periféricos.

La gran diferencia entre las tasas de síntesis y recambio de las catecolaminas cerebrales (NA y DA) puede deberse al hecho de que hay una mayor concentración de tirosina-hidroxilasa asociada a las neuronas dopaminérgicas. Las zonas cerebrales dopaminérgicas poseen mayor actividad de tirosina-hidroxilasa y tasas de recambio que las zonas noradrenérgicas.

1.4.- ALMACENAMIENTO.

La noradrenalina y la dopamina se localizan dentro de partículas subcelulares especializadas denominadas granulos, en las terminaciones nerviosas simpáticas, en las células cromafines y en las neuronas centrales. Estas vesículas tienen muchas propiedades generales:

1.-Poseen una membrana externa limitante;

2.^o 2.^o
2.-Contienen ATPasa dependiente de Mg y Ca .

Las posibles funciones de estas vesículas son:

1.-Fijan y almacenan catecolamina, retardando su difusión fuera de la neurona, protegiéndola de la destrucción por la Monoaminoxidasa (MAO), que se considera es intraneuronal.

2.-Sirven como depósito de neurotransmisor que puede ser liberado bajo estímulos fisiológicos adecuados.

3.-Oxidan la dopamina a noradrenalina (en el caso de células noradrenérgicas).

Las vesículas son formadas en el cuerpo celular de la neurona y posteriormente son transportadas a la terminación nerviosa.

1.5.- LIBERACION.

Se cree que el mecanismo de liberación de las catecolaminas periféricas es el siguiente: con la actividad de las fibras preganglionares, se libera acetilcolina y se combina con la membrana plasmática de las células cromafines. Esto produce un cambio en la conformación de la proteína de la membrana, lo que altera la permeabilidad de dicha membrana al Ca²⁺ y otros iones que puedan penetrar. La entrada de Ca²⁺ es el principal estímulo responsable de la movilización de las catecolaminas y su secreción. Las catecolaminas son liberadas de las células cromafines por un proceso de exocitosis, en las terminales nerviosas simpáticas la liberación no ocurre únicamente por exocitosis, ya que esto implica la liberación de todo el contenido granular.

Los factores humorales endógenos regulan la liberación de catecolaminas por una acción local directa sobre las terminaciones nerviosas. Los receptores presinápticos modulan la libera-

ción al responder a la concentración de catecolaminas en la sinapsis, altas concentraciones inhiben la liberación y bajas concentraciones aumentan la liberación.

1.6.- METABOLISMO.

Las enzimas de mayor importancia en la degradación metabólica de catecolaminas son la monoaminaoxidasa (MAO), que convierte las catecolaminas en sus correspondientes aldehídos y la catecol-O-metiltransferasa (COMT), que cataliza la transferencia de grupos metilo al grupo m-hidroxilo de las catecolaminas. (Esquema No. 1)

La inhibición de la monoaminaoxidasa no potencia los efectos de la estimulación nerviosa simpática periférica, de la misma manera la inhibición de la actividad de la COMT no potencia notablemente los efectos de la estimulación nerviosa simpática, aunque en algunos tejidos tiende a prolongar la duración de las respuestas a la estimulación, por lo que no constituyen el paso primario para detener la acción de la NA liberada en las terminaciones nerviosas simpáticas.

Un metabolito importante de la noradrenalina que se encuentra en el cerebro es el 3-metoxi-4-hidroxi-feniletilenglicol (MHPG). Al determinar sus niveles urinarios, plasmáticos o en líquido cefalorraquídeo se cuenta con un indicador de la actividad neuronal noradrenérgica.

Los principales metabolitos de la dopamina son el ácido homovanílico (HVA) y el ácido dihidroxi-fenilacético (DOPAC).

Un excelente indicador de la actividad funcional de las neuronas dopaminérgicas cerebrales, al determinarse sus niveles

en líquido cefalorraquídeo, es el ácido homovainílico, el cual se ve disminuido en enfermedades como el mal de Parkinson debido a una destrucción parcial de las neuronas dopaminérgicas y cambios degenerativos en la sustantia nigra.

1.7.- CAPTACION.

Al estimularse los nervios simpáticos posganglionares a frecuencias similares a las fisiológicas, muy poco neurotransmisor intacto fluye a la circulación, lo que indica que la inactivación local es eficaz, ya que no se afecta al inhibirse la COMT y/o la MAO, lo que implica la recaptura del neurotransmisor por las neuronas simpáticas.

La captación de catecolaminas es activa ya que sucede frente a un gradiente de concentración, es dependiente de la temperatura y de la presencia de iones Na y requiere energía.

La captación de catecolaminas es mediada por una clase de mecanismo de transporte activo de membrana localizado en la membrana terminal presináptica de las neuronas simpáticas posganglionares.

2.- SEROTONINA.

La serotonina (5-HT) es el neurotransmisor que más interviene en la neuropsicofarmacología. La naturaleza indolica de esta sustancia es similar al LSD, con el cual puede interactuar a nivel de músculo liso in vitro. Al estudiarse los efectos de la 5-HT en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos, se ha observado que diversas formas de enfermedades mentales se deben a anomalías químicas en la síntesis de 5-HT. Esto se ha comprobado al observarse que cuando se administra reserpina, esta agota los niveles cerebrales de 5-HT, observándose una depresión profunda en el humano que aumenta conforme disminuyen los niveles de serotonina.

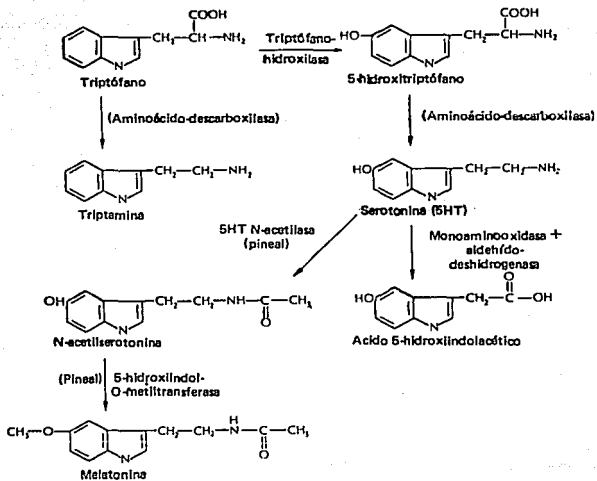
2.1.- BIOSÍNTESIS DE SEROTONINA.

Además de encontrarse en las neuronas, la serotonina se encuentra en las plaquetas, células cebadas y células enterocromafines. Solo del 1-2 % de la serotonina corporal se encuentra en el cerebro, y en él se sintetiza, ya que no puede atravesar la barrera hemato-encefálica.

En las células cerebrales, el primer paso es la captación del aminoácido triptófano, (Esquema No. 2) que es el sustrato primario para la síntesis y que proviene de la dieta. Un proceso activo de captación facilita la entrada de triptófano a las células, el cual es compartido para el transporte de otros aminoácidos.

Debido a que el triptófano tiene una variación rítmica diaria en su concentración, esto puede influir en la tasa de síntesis de la serotonina cerebral.

ESQUEMA No. 2



BIOSINTESIS Y METABOLISMO DE SEROTONINA.

El segundo paso en la vía sintética es la hidroxilación del triptofano para formar 5-hidroxitriptofano (5-HTP). (Esquema No.2)

Una vez sintetizado el 5-HTP es inmediatamente descarboxilado para obtener serotonina (5-HT).

Se ha puesto mucha atención en el segundo paso de la síntesis de serotonina, especialmente en individuos tratados con fármacos psicoactivos que afectan los sistemas serotoninérgicos como modo primario de acción. Esto se debe a que la síntesis, almacenamiento, liberación y respuesta del neurotransmisor, son procesos dinámicos y los desequilibrios agudos producidos por los fármacos son balanceados rápidamente por la naturaleza interna de retroacción que tiene la regulación de la síntesis. Si un fármaco reduce la actividad de la triptofano-hidroxilasa, las células nerviosas responden incrementando la síntesis de la enzima y transportando cantidades mayores a las terminaciones nerviosas.

2.2.- CATABOLISMO.

La única ruta eficaz de catabolismo de la serotonina es la desaminación oxidativa por la enzima monoaminoxidasa (MAO). (Esquema No. 2) El 5-hidroxiindolacetaldehído que es el producto de esta reacción puede ser oxidado a ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) o reducido a 5-hidroxitriptofol dependiendo de la relación NAD / NADH en el tejido.

2.3.- EFECTOS CELULARES DE LA SEROTONINA.

Se sabe que las neuronas que contienen serotonina están limitadas a grupos de células que se encuentran en la línea media o cerca de ésta en las regiones del rafe de la protuberancia y parte superior del tallo cerebral, y no solo se encuentra dentro

de las células nerviosas sino también en tractos específicos de las proyecciones nerviosas.

La serotonina tiene una vida media muy larga, causa una pronunciada activación en la tasa de descarga, produce una acción lenta despolarizante acompañada por un incremento leve en la resistencia de la membrana, no activa a la adenilato ciclasa en el cerebro de mamíferos adultos (a pesar de que hay activación de esta por la serotonina en cerebro de fetos o embriones de mamíferos) y produce en forma fundamental efectos inhibitorios.

La captación de serotonina es menos selectiva o específica que la captación de catecolaminas, la mayor parte de la captación se localiza en los nervios que contienen serotonina, pero la mayor parte se concentra en las terminaciones y axones. El sistema de captación es similar al observado para catecolaminas, ya que depende de energía, requiere glucosa y oxígeno y puede ser inhibido por la ouabaina, el 2,4-dinitrofenol y el yodoacetato.

El sistema de captación de 5-HT puede ser parcialmente inhibido por el mismo tipo de fármacos que inhiben la captación de catecolaminas en las terminaciones nerviosas que contienen catecolaminas.

2.4.- SÍNDROME SEROTONINÉRGICO.

Estudios histoquímicos han identificado al núcleo del ratón como el cuerpo cerebral que contiene en mayor proporción células serotoninérgicas. El papel de la serotonina en el sistema nervioso central ha sido extensamente estudiado utilizando una gran variedad de técnicas, en particular el análisis de sitios receptores ha significado una aproximación productiva a la comprensión

de las acciones de serotonina y farmacos relacionados. Neurofisiologicamente la variabilidad de efectos de serotonina y farmacos relacionados llevb a la hipotesis sobre la existencia de multiples receptores de serotonina en el sistema nervioso central. Por lo menos cuatro subtipos de sitios de union para serotonina han sido diferenciados en homogenados de cerebro. Estudios anatomicos han confirmado que existe una variedad de sitios de reconocimiento para serotonina con diferente localizacion regional en el sistema nervioso central. Utilizando radioligandos se encontro que en la region CA y giro dentado del hipocampo, nucleo del rafe, septum y corteza cerebral se encuentran presentes en gran cantidad receptores del subtipo 5-Ht .

1A

Los receptores 5-Ht han sido muy dificiles de caracterizar, los cuerpos en los que se encuentran en mayor abundancia son el nucleo caudado, colliculo superior, cuerpo lateral geniculado, subicullum, globus palidus y substantia nigra.

Los sitios 5-Ht fueron caracterizados principalmente en membranas de plexo coroideo y corteza. Estos sitios tienen alta afinidad por la serotonina, aunque los antagonistas serotoninergicos tambien tienen alta afinidad por estos sitios, la accion de serotonina y triptaminas relacionadas es marcadamente menos potente.

Los receptores del subtipo 5-Ht se encuentran en gran cantidad en la cuarta capa de la corteza cerebral. El numero de estos receptores puede disminuir por la indicacion de tratamientos crbnicos con farmacos antidepresivos, esto sin afectar la cantidad de receptores del tipo 5-Ht .

1

El desarrollo y la caracterización de agentes farmacológicos que bloqueen selectivamente los sitios de unión serotoninérgicos, han aclarado el papel de los subtipos de receptores en la mediación de conductas específicas.

La estimulación de la serotonina central con fármacos serotoninérgicos, como el 5-Hidroxitriptofano, p-cloroamfetamina, etc. produce una conducta hiperactiva y compleja. El síndrome incluye tremor (temblor), forepaw treading (movimiento semejante al movimiento de los brazos en el boxeo), flat body posture (posición del vientre muy pegado al piso), head weaving (movimientos ondulatorios de la cabeza), hindlimb abduction (abducción de los miembros traseros), straub tail (erección de la cola) y body and head shakes (sacudidas de la cabeza y el cuerpo).

Se han hecho estudios para correlacionar cada una de estas conductas con la ocupación de los receptores 5-Ht₁ y 5-Ht₂, encontrándose que al activar los receptores 5-Ht₁ los componentes conductuales producidos son: forepaw treading, tremor y head weaving; al activarse los receptores 5-Ht₂ únicamente se observa body and head shakes. Se encontró que el componente flat body posture se produce por la activación de los receptores 5-Ht₁.

Otros efectos conductuales han sido atribuidos a subtipos específicos de receptores serotoninérgicos. Mediante distintos estudios conductuales se ha concluido que los agonistas de serotonina tienen respuesta conductual mediada por receptores del subtipo 5-Ht₂. En ratas macho la administración de agonistas

5-Ht₁ selectivos facilita la emisión de semen y/o la eyacuación.

C.- TÉCNICAS ANALÍTICAS.

1.- CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

1.1.- GENERALIDADES.

Cromatografía ha sido definida como un método de separación en el que mezclas de compuestos son separadas por la migración diferencial de sus constituyentes durante el paso a través de una columna cromatográfica. El proceso de separación esta regido por la distribución de sustancias en 2 fases: la fase móvil y la fase estacionaria. El tipo de interacción que resulta entre las moléculas de soluto y las moléculas de cada fase esta determinada por las propiedades físicas y químicas de las moléculas de soluto en un medio determinado.

Las fuerzas básicas de operación ejercidas sobre los solutes pueden deberse a la polaridad, campos eléctricos inducidos o fuerzas de Van der Waals que dependen de las masas relativas de las moléculas de soluto y disolvente.

Después de que la muestra ha pasado a través del lecho cromatográfico, el líquido que emerge de la columna, esta compuesto por la muestra (eluato) y la fase móvil (eluyente).

El uso de fases estacionarias no polares y fases móviles polares en sistemas cromatográficos fue sugerido por Boscott en 1947. En 1948 Boldingh utilizó una columna empacada con hule en polvo y una mezcla de metanol y agua para separar ácidos grasos de cadena larga. La técnica fue llamada fase Inversa por Howard y Martin, que también usaron como fase estacionaria n-octano y parafina líquida para separar ácidos grasos. La fase inversa fue

usada principalmente para separar solutos no polares hasta que Martin y Porter usaron esta tecnica para fraccionar ribonucleasa.

El auge de la Cromatografia de liquidos en fase inversa (RPLC) empezò con el trabajo de Halasz y Sebastian, quienes popularizaron el metodo de enlace quimico de las fases estacionarias. Este parteaguas en la tecnologia de columnas fue mejorado con el desarrollo de materiales particulados y la introduccion de materiales microparticulados.

La gran simplicidad operacional de los sistemas de fase inversa se debe a las debiles energias de superficie de la fase estacionaria enlazada, y a la debilidad de las fuerzas de atraccion entre moleculas de soluto, fase estacionaria y fase mvil.

Los analisis son rapidos y los tiempos de reequilibrio durante el cambio del disolvente son cortos. Usualmente se requiere de 5 a 10 volúmenes de columna para el reequilibrio, que es considerablemente menor que en cromatografia de fase normal.

1.2.- DEFINICIONES Y ECUACIONES BASICAS.

Tiempo de retencion: Se define como el tiempo que pasa desde el momento en que es inyectada la muestra hasta que se obtiene el punto de maxima concentracion del pico eluido.

Volumen de retencion: Es el volumen total de fase mvil necesario para eluir el centro de la banda cromatografica. Puede ser calculado a partir del flujo (F) y el tiempo de retencion (tr).

$$V_r = t_r F$$

El volumen de retención se relaciona con el coeficiente de partición (K) a través de la siguiente ecuación:

$$V_r = V_m + KV_s$$

donde: V_m es el volumen de fase móvil y V_s el volumen de fase estacionaria.

Volumen muerto: Es el volumen intersticial entre las partículas de material de empaque y el volumen accesible entre los poros de las partículas.

Factor de capacidad: Es la relación entre el volumen de retención y el volumen muerto.

$$K' = V_r - V_o / V_o$$

Selectividad: Es la relación entre los factores de capacidad.

$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1}$$

Eficiencia de la columna: Esta dada por el número de platos teóricos de la columna (unidades teóricas de equilibrio).

$$N = 5.54 \left(\frac{Tr}{W} \right)^2$$

Resolución: Es la medida en la que 2 picos de solutos diferentes están separados a través de su paso por la columna.

$$R_s = \frac{2(Tr_2 - Tr_1)}{W_1 + W_2}$$

Integrando las ecuaciones de eficiencia de la columna, selectividad y factor de capacidad en la ecuación de resolución se obtiene la expresión:

$$R_s = \frac{1}{4} (N)^{1/2} (a-1/a) \left(\frac{k'_2}{k'_1} + 1 \right)$$

Tiempo de análisis: Es el tiempo requerido para realizar una buena separación en un tiempo mínimo.

$$T_r = 16R_s^2 (a/a-1) [(1 + k')^3 / k']^2 (H/t)$$

La retención de un compuesto puede ser alterada por cambios en la naturaleza química y/o temperatura de las fases cromatográficas y cambios en los volúmenes de las fases.

Los valores del factor de capacidad son característicos para cada soluto. Los cambios de disolvente producen cambios significativos en los valores de k' , siendo una vía de optimización adecuada para la separación, el uso de mezclas de disolventes.

Disolventes polares y/o sus mezclas son usadas comúnmente en separaciones en fase inversa y su fuerza de elución es inversa comparada con la serie elutriónica de Snyder para alumina.

Las interacciones intermoleculares entre soluto y disolvente pueden ocurrir mediante cinco posibles mecanismos:

1.- **Fuerzas de dispersión (Fuerzas de Van der Waals o Fuerzas de London):** Opera entre moléculas con asimetría de configuración electrónica momentánea.

2.- **Interacciones dipolo:** Un dipolo temporal en una molécula polarizará los electrones de moléculas adyacentes y los dipolos inducidos producirán atracción electrostática entre las moléculas.

3.- **Puentes de Hidrogeno:** Ocurren entre un donador de protones y un aceptor de protones. El grado de interacción depende de la acidez y basicidad relativas de las moléculas involucradas.

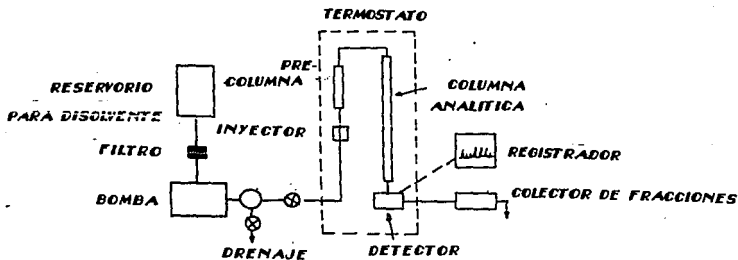
4.- **Interacciones dieléctricas:** Resultan de la atracción electrostática de moléculas de soluto con un disolvente de alta constante dieléctrica.

5.- **Interacciones electrostáticas.**

La atracción entre moléculas de soluto y disolvente es usualmente una combinación de los cinco tipos de interacciones. El grado de interacción de un soluto o disolvente en especial está referido a su polaridad. La fuerza de un disolvente está relacionada directamente con su polaridad, por ejemplo, en cromatografía de fase normal la fuerza del disolvente aumenta conforme su polaridad, mientras que en cromatografía en fase inversa, la fuerza del disolvente disminuye conforme aumenta su polaridad.

1.3.- SISTEMA CROMATOGRAFICO.

Un equipo de cromatografía de líquidos está integrado por los siguientes sistemas:



ESQUEMA No.3

- Un sistema de suministro de disolventes que consta de contenedor de disolvente, degasificador, bomba(s) y programador de elución por gradiente.
- Un sistema de introducción de muestra.
- Precolumna y Columna Analítica.
- Controlador de temperatura.
- Detectores.
- Colector de fracciones.
- Instrumentos para registro de datos: Registrador, Integrador o Computadora.

De acuerdo al tipo de bomba utilizada, es necesario que el equipo cumpla con las siguientes características para llevar a cabo satisfactoriamente sus funciones:

- 1.- Flujo constante (0.1-10 mL/min, variación máxima del 2%)
- 2.- Alta presión máxima.
- 3.- Variación de flujo en intervalos discretos.
- 4.- Fluctuación de presiones mínima.
- 5.- Baja señal de ruido.
- 6.- Simplicidad operacional.
- 7.- Químicamente inerte a los disolventes de uso común.

En la siguiente sección se describen brevemente las partes principales de un sistema cromatográfico, sus funciones y clasificación.

DEGASIFICADOR. Debido a la presión ejercida dentro de la columna, disminuye la solubilidad de los gases disueltos en la fase móvil, permitiendo la formación de burbujas (particularmente en las mezclas alcohol-agua). La presencia de burbujas en el sis-

tema cromatográfico es indeseable porque causan variaciones en el flujo, afectan la resolución y causan inestabilidad en los detectores con celdas de paso.

BOMBAS. El propósito de la bomba es suministrar la fase móvil a una presión o velocidad de flujo controlada con precisión. Las bombas utilizadas en cromatografía de líquidos son de 2 tipos principalmente: Bombas de presión constante y bombas de flujo constante (las más utilizadas).

Dependiendo del principio de operación, las bombas se clasifican en:

1.- Bombas neumáticas: Emplean la presión de un gas (He o N₂) para regular y/o mantener la presión del eluyente.

2.- Bombas tipo jeringa: Operan bajo el principio de desplazamiento de disolventes desde un cilindro (250-500 mL) utilizando un pistón que avanza a velocidad constante. Se utilizan principalmente en técnicas de elución por gradiente, donde se utilizan disolventes con diferentes viscosidades.

3.- Bombas recíprocas: Las hay de dos tipos básicamente: bombas de pistón recíprocante, en las que el pistón está en contacto directo con el líquido que se impulsa, y las bombas de membrana o diafragma en las que el movimiento del pistón es transmitido a un diafragma o membrana a través de un sistema hidráulico.

4.- Bombas hidráulicas amplificadoras: Son similares a las bombas neumáticas, excepto en que usan un fluido de baja presión (aceite), en vez de gas para impulsar el líquido.

PROGRAMADOR DE ELUCIÓN POR GRADIENTE. Genera un cambio gradual en la composición de la fase móvil durante el curso de la separación. Existen dos tipos de sistemas: Los sistemas de gra-

diente de baja presión, en los que el perfil de gradiente está determinado por el volumen de líquido en la cámara de mezcla y por la velocidad a la que los disolventes son modificados y los sistemas de alta presión que son capaces de generar mezclas de disolventes de diferente composición por operación isocrática.

DISPOSITIVOS DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA. Los más utilizados corresponden a la siguiente clasificación:

Inyectores con septum para jeringa: Es el modelo más simple y barato, en el las muestras son inyectadas a la parte superior de la columna a través de un septum autosellable (hecho de elastómeros fluorados) por medio de una jeringa.

Inyectores para jeringa sin septum: Con inyectores de este tipo, la introducción de la muestra se efectúa colocando la jeringa en un cubo de inyección, sellándose la aguja por compresión de las ferrulas, e inyectando la muestra en la columna después que se abre el puerto de inyección.

Sistemas de inyección con válvula: Permiten la introducción de volúmenes precisos en el sistema cromatográfico. Operan por inyección de la muestra a presión atmosférica en una cavidad o aro externo, seguida por su introducción en la corriente de fase móvil por acción de un rotor.

COLUMNAS ANALÍTICAS. Es donde se lleva a cabo la separación cromatográfica de los constituyentes de una muestra. Los soportes utilizados más frecuentemente son:

1.- **Silica:** Es un polímero de ácido silícico con fórmula general $SiO_2 \cdot xH_2O$.

2 2

2.- Soportes tipo éster: Preparados por reacción de grupos silanol con alcoholes.

3.- Soportes tipo Amino: Poseen alta estabilidad térmica e hidrolítica pueden ser usados en rangos de pH de 3 a 8.

4.- Soportes tipo carbono: Materiales de empaque del tipo -Si-CR₃, térmica e hidrolíticamente estables, transfieren masa rápidamente.

5.- Soportes tipo siloxano: Se preparan por la reacción de grupos silanol con organoclorosilanos.

6.- Copolímeros de estireno-divinilbenceno.

7.- Soportes de carbono modificado: Se utilizan principalmente para la separación de series homólogas de solutos que difieren ligeramente en peso molecular.

DETECTORES. Su propósito es visualizar la separación realizada por la columna cromatográfica, sin influenciar la separación. Se subdividen en dos categorías: detectores de propiedades del conjunto, donde se compara una propiedad de la fase móvil, contra la misma propiedad del soluto, por ejemplo, índice de refracción, conductividad, constante dieléctrica, etc. y detectores de propiedades del soluto, que miden únicamente las propiedades del soluto, por ejemplo, absorción UV, picos polarográficos, etc.

Dependiendo del principio de operación, un detector debe cumplir con las siguientes especificaciones:

- 1.- Bajo nivel de ruido.
- 2.- Alta sensibilidad.
- 3.- Respuesta rápida.
- 4.- Amplio rango lineal dinámico.
- 5.- Bajo volumen muerto.

- 6.- *Diseño de la celda que impide se mezclen las bandas resueltas.*
- 7.- *Insensibilidad a los cambios de disolvente, velocidad de flujo y temperatura.*
- 8.- *Simplicidad operacional.*
- 9.- *Ajustable, para optimizar la detección de diferentes compuestos.*
- 10.- *No destructivo.*

Los detectores mas utilizados son:

1.- *D. Espectrofotométrico: Su principio de operación consiste en la medición de absorbancias de luz en el rango UV o visible.*

2.- *D. Fluorométrico: Se utiliza principalmente en la detección de compuestos biológicos con propiedades fluorescentes.*

3.- *D. de Índice de refracción: Cuantifica a las sustancias de interés midiendo los diferentes índices de refracción de los líquidos contenidos en la muestra y celdas de referencia.*

4.- *D. Electroquímico: Su principio de operación esta sustentado en la modificación de las propiedades oxido-reductoras de los compuestos biológicos de interés.*

5.- *D. de Radioactividad: Se utiliza particularmente en estudios de metabolismo, análisis de pesticidas, etc.*

6.- *D. de Constante Dieléctrica: Miden el cambio en la capacidad de un condensador por el paso del efluente cromatográfico a través de sus placas.*

7.- *D. de Conductividad Eléctrica: Se utiliza para la determinación de especies iónicas orgánicas e inorgánicas.*

8.- *D. de Calor de Adsorción:* El elemento sensible al calor mide continuamente los cambios en la temperatura del adsorbente en la fase móvil, debido a los procesos de adsorción-desorción de las moléculas de soluto.

9.- *Sistemas de Cromatografía de Líquidos asociado a espectrometría de masas.*

10.- *D. de reacción.*

1.1.- DETECTOR ELECTROQUÍMICO.

El uso de electroquímica hidrodinámica en capa delgada para detectar compuestos electroactivos en un eluyente cromatográfico es reciente. El desarrollo de detectores electroquímicos ha sido causado por la sensibilidad insuficiente de muchos de los detectores utilizados comúnmente para análisis de trazas de compuestos biológicamente importantes. Los compuestos pueden ser detectados en estado oxidado o reducido y el potencial aplicado puede controlarse hasta obtener la máxima sensibilidad.

Los detectores electroquímicos poseen muchas ventajas en estos aspectos:

- 1.- *Alta sensibilidad.*
- 2.- *Selectividad.*
- 3.- *Compatibilidad con los sistemas de fase inversa.*
- 4.- *Amplio rango lineal.*

Los detectores electroquímicos comerciales pueden detectar desde picogramos, aun hasta femtogramos, de compuestos electroactivos, su uso ha abierto nuevas áreas en la investigación química en las que era difícil o imposible ir más allá. El límite de detección está determinado por la relación señal-ruido y depende

de la velocidad de la reacción electroquímica y el nivel de la corriente residual.

El primer factor depende del coeficiente de difusión del soluto, el área del electrodo y la velocidad de flujo. La corriente residual está determinada por la magnitud, signo y duración del voltaje de corriente directa aplicado, variaciones de presión en el flujo y la presencia de impurezas en el sistema de disolventes. Por variación del voltaje de polarización y/o composición del eluyente, puede afectarse marcadamente la reactividad electroquímica de los grupos funcionales.

Debido a la necesidad de un medio conductor eléctrico, la elección de disolventes compatibles con el electroanálisis es limitada. Soluciones amortiguadoras acuosas y sus mezclas con modificadores orgánicos como acetonitrilo y metanol usados en operaciones en fase inversa producen alta conductividad y son buenos para el trabajo electroquímico.

Variaciones analíticas en la detección electroquímica conducen a dos diferentes técnicas:

1.- Voltamétrica: El voltaje aplicado varía continuamente por un periodo de tiempo y la corriente resultante es medida.

2.- Amperométrica: El potencial se mantiene en un valor constante y la corriente es medida.

En cualquiera de estas técnicas, siempre se mide la corriente a través de la interfase del electrodo de trabajo.

Usualmente se emplea un sistema potencioestático de tres electrodos, formado por un electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar de acarreo de corriente y un electrodo de referencia. Un

dispositivo electrónico mantiene el potencial del electrodo de referencia en un valor determinado, el electrodo de trabajo puede ser un electrodo de gota de mercurio, o un electrodo sólido hecho de pasta de carbono, carbono vítreo o platino.

En los electrodos sólidos puede observarse adsorción de solutos que obstruyan la superficie, aumentando las velocidades de reacción y disminuyendo la sensibilidad. El rango catódico es menor que el de los electrodos de gota de mercurio, pero su rango anódico se extiende hasta +1.5 V vs. Ag/AgCl.

1.5.- TÉCNICA DE PAR IÓNICO.

El análisis de compuestos ionizables es difícil debido a que presenta continuamente problemas con respecto a retención de soluto, simetría de picos y eficiencia en la separación. Los compuestos iónicos y altamente polares no pueden analizarse directamente usando fase inversa debido a que eluyen cerca del volumen muerto.

Una forma inversa de la cromatografía de par iónico, usada primero por Horvath y Lipsky en 1966, introdujo cambios drásticos en la retención de compuestos iónicos y altamente polares en presencia de agentes de asociación iónica (par iónico) que tenían una gran parte hidrofóbica. En 1975 Wahlund aplicó esta técnica a los sistemas de cromatografía de líquidos en fase inversa y desde entonces esta aplicación ha continuado creciendo.

En un pequeño periodo de tiempo esta técnica ha sido conocida como: cromatografía de jabón, cromatografía de par iónico, cromatografía dinámica de intercambio iónico generada por disolvente, cromatografía hataerica, intercambio catiónico detergente

dependiente, cromatografía ion-solvofóbica, cromatografía con surfactantes y más recientemente cromatografía de asociación iónica. Lo que indica que para ser una técnica tan exitosa existe una gran confusión concerniente a la naturaleza de la retención.

En la Tabla No. 1 se presentan las principales ventajas de la cromatografía de líquidos en fase inversa, donde se indica brevemente porque esta técnica es el método de elección para el análisis de de compuestos biológicos principalmente.

Basicamente existen cuatro tipos de equilibrio termodinámico que explican la función del agente de par iónico:

1o.- Se postula que los iones alquílicos hidrofóbicos son adsorbidos por el material de empaque de fase inversa, que actúa como un intercambiador dinámico de iones.

2o.- Se postula que el reactivo de asociación iónica es fuertemente adsorbido por la fase estacionaria no polar, formando una capa primaria cargada que es compensada electrostáticamente por los iones del eluyente. Solutos con la misma carga que la capa primaria experimentarán repulsión electrostática por esta capa y serán eluidos rápidamente. Solutos de carga opuesta serán retenidos por la capa primaria y su retención incrementará conforme aumente la carga de la capa primaria. La retención es entonces causada por interacciones coulombicas de los iones de soluto con la fase estacionaria modificada.

3o.- Se propone una combinación de los dos modelos anteriores y se sugiere que la concentración del agente de asociación iónica posee efectos en los factores de retención.

TABLA No.1 VENTAJAS DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS EN FASE INVERSA.

- 1.- Simplicidad Operacional.
- 2.- Disponibilidad de columnas con alta eficiencia y selectividad.
- 3.- Amplio rango de sistemas de disolventes.
- 4.- Compatibilidad de sistemas de disolventes con muchas muestras, particularmente aquellas que contienen moléculas biológicas.
- 5.- Análisis y equilibración rápidas.
- 6.- Posible uso de equilibrios químicos secundarios
- 7.- Compatibilidad con equipos de detección que operen en medio acuoso.
- 8.- Gran número de empaques de fase inversa disponibles.
- 9.- Uso de la fase inversa como herramienta para medidas físico-químicas.

10.- Intercambio dinámico complejo, de acuerdo con este modelo, los pares iónicos formados en la fase móvil se enlazan con la fase estacionaria cubierta con el agente de asociación iónica.

Debe enfatizarse que estos equilibrios representan casos limitantes y que el proceso de retención no sigue ninguno de ellos en un rango amplio de condiciones cromatográficas.

Algunas investigaciones indican que con moléculas de cadena larga como agentes de asociación iónica, ésta no tiene lugar en la fase móvil, las hipótesis que sustentan esto son las siguientes:

1.- Son necesarios un gran número de volúmenes de columna para desplazar el reactivo de asociación iónica.

2.- Los factores de capacidad de los solutos disminuyen con fases móviles que contienen reactivos de asociación iónica de la misma carga.

3.- Mediciones de conductancia demuestran que la formación del par iónico no ocurre en fase móvil.

4.- La retención de moléculas neutras es independiente de la concentración de reactivo de asociación iónica hasta un rango determinado.

5.- El grado de retención es directamente proporcional a la densidad de carga superficial producida por la adsorción del agente de asociación iónica.

Factores adicionales que juegan un papel importante en la separación :

1.- Tipo de contra-ión y grado de interacción con el soluto.

2.- *Tamaño del contra-ión.*(Mayor tamaño produce mayor retención).

3.- *Concentración del contra-ión.*(Mayor concentración produce incrementos en los valores de K').

4.- *pH del medio.*(Aumenta la retención si el pH es en el que el soluto está completamente ionizado).

5.- *Tipo y concentración del modificador orgánico en la fase mvII.* (La retención disminuye cuando aumenta la concentración del modificador orgánico).

6.- *Temperatura.* (Tiene un gran efecto en la asociación iónica y es una variable importante en la optimización de la selectividad).

7.- *Recubrimiento de la fase estacionaria (χ).*(Es necesario el máximo recubrimiento de la superficie de sílica para evitar la formación de bandas suplementarias).

La selección del contra-ión es importante debido a que juega un papel preponderante en la resolución de una mezcla de compuestos. En la Tabla No. 2 se ejemplifican los contra-iones de uso frecuente y su aplicación principal.

1.6.- ANALISIS DE MONOAMINAS.

Muchas de las aminas biogénicas son altamente sensibles a la luz y oxígeno, se descomponen rápidamente al exponerse al aire y sufren oxidación espontánea a pH alcalino. A diferencia de los análisis cromatográficos de columna abierta, la oxidación y exposición a la luz están minimizados en el análisis cromatográfico de fase inversa para estos compuestos. Esto, además de la rapidez

TABLA No. 2 SELECCION DE CONTRA-IONES.

<u>TIPO DE CONTRA-ION.</u>	<u>APLICACION PRINCIPAL.</u>
Aminas Cuaternarias. (tetrametil, tetrabutil, palmitil, iones trimetilamonio)	Acidos débiles y fuertes. Compuestos sulfonados. Acidos carboxilicos. Hidrocortisona y sales.
Bis-(2-etilhexil)fosfato	Fenoles
Sulfonatos de alquilo. (metil-, pentil-, hexil-, heptil-sulfonatos)	Bases fuertes y débiles. Sales de benzalconio. Catecolaminas, péptidos Alcaloides opiáceos. Niacina, Niacinamida.
Acido Perclórico.	Forma fuertes pares con un amplio rango de compuestos básicos como: aminas, ácidos iodoaminotiroideos, péptidos, etc.
Sulfatos de alquilo. (octil-, decil-, dodecil-,)	Similar a ácidos sulfónicos. Diferente selectividad.

y la sensibilidad hacen de la cromatografía en fase inversa el método de elección para estos análisis. El desarrollo de detectores electroquímicos ha eliminado la necesidad de derivatización para el análisis de monoaminas.

La detección amperométrica de catecolaminas se debe a la oxidación de las aminas a las correspondientes o-quinonas y la corriente resultante es proporcional a la concentración de las especies electroactivas.

2.- VOLTAMPEROMETRIA DE REDISOLUCION ANODICA.

2.1.- GENERALIDADES.

La técnica de voltamperometría anódica de redisolución se basa en la concentración mediante electrodeposición de iones metálicos electroactivos sobre un electrodo de capa o gota de mercurio por aplicación de un potencial negativo vs. Ag/AgCl por un periodo de tiempo de 1-5 minutos.

Después del electrodeposito, el potencial del electrodo varía linealmente en dirección anódica (positiva) y los metales son liberados del electrodo. Cuando cada metal regresa a solución se observa un pico de corriente, el área de este pico es directamente proporcional a la concentración de iones metálicos en la capa de mercurio y la localización del pico indica cual metal está presente.

2.2.- DEFINICIONES Y ECUACIONES BASICAS.

Potencial de media onda: El potencial de media onda de un ion metálico en una solución determinada es una constante relacionada con la tendencia del metal a transferir electrones en las condiciones químicas existentes en esa solución particular.

Cuando la solución no interactúa con el electrodo, el potencial formal determina cuando ocurrirá la formación del pico de potencial de redisolución.

Pico de Potencial: Es el potencial en el que se observa el pico de un elemento determinado. Depende del Potencial Formal y de la velocidad de barrido.

Potencial Inicial (Potencial de Deposición): Es el potencial aplicado entre los electrodos de referencia y trabajo du-

rante el periodo de tiempo en el que el ion metálico está siendo acumulado sobre el electrodo. La magnitud del potencial inicial determina que iones se depositan en el electrodo, siendo los más electronegativos los que recubren primero el electrodo.

Velocidad de Barrido: Es la velocidad con la que se redissuelve el metal adherido al electrodo. Se expresa en mV/seg o para "redisolución escalonada" (redisolución que se efectúa por una serie de pequeños cambios de potencial) se indica por mV/paso. (1mV/paso = 10 mV/seg)

Tiempo de Deposición (Tiempo de Análisis): Es el periodo de tiempo en el que se aplica el potencial inicial entre los electrodos de trabajo y referencia con el propósito de depositar el metal o metales de interés sobre el electrodo de trabajo. El tiempo de deposición depende del tiempo medio de la celda.

Tiempo Medio de Celda: Es el tiempo requerido para tomar la mitad de los iones metálicos presentes en solución fuera de la celda y depositarlos sobre el electrodo. Depende de: El volumen de la celda, el tipo de ion metálico y solución y la velocidad de agitación.

Potencial Final: Es el potencial al cual ocurre la redisolución del metal de interés que recubre el electrodo. Se selecciona el valor de potencial en el que se redissuelven todos los metales de interés, sin afectar la capa de mercurio que recubre el electrodo.

Electrodo de Trabajo: Es el electrodo donde las reacciones de interés analítico se llevan a cabo. Este electrodo y las reacciones que ocurren en él, están controladas por el potencial establecido medido contra un electrodo de referencia.

Electrodo de Referencia: Exhibe un potencial fijo en una escala arbitraria de potenciales y en consecuencia provee un punto fijo contra el cual medir otros procesos electroquímicos.

Electrodo Auxiliar: Proporciona la corriente o los electrones requeridos para la reacción que ocurre en el electrodo de trabajo.

Zona de Electroactividad: Es la zona que limita a los potenciales inicial y final y depende de las propiedades químicas de la celda. El extremo negativo (catódico) de esta zona está limitado por la formación de H_2 a partir de los iones H^+ que se encuentran en solución.

El extremo positivo (anódico) de la zona está limitado por las reacciones de la capa de mercurio para formar iones Hg^{2+} o Hg_2^{2+} o una sal de mercurio. Esto depende de la matriz que se emplee, ya que si están presentes en solución iones cloruro o EDTA, estos reaccionan con el mercurio a un potencial anódico menor, destruyéndose paulatinamente la capa de mercurio.

Señales de la Curva de Redisolución: Se considera que una curva de redisolución está formada por tres componentes:

- 1.- Corriente Faradaica (i_f): Es la señal de interés analítico.
- 2.- Corriente Capacitiva (i_c): Es la corriente debida al electrodo de trabajo que se comporta como capacitor.
- 3.- Corriente Faradaica de Fondo (i_b): Es la corriente doblada al 0 residual, iones H^+ y otras especies electroactivas en solución.

La contribución relativa de estas corrientes a la señal de redisolución anódica, puede ser incrementada aumentando los tiempos de depositación, ya que las corrientes capacitiva y faradaica de fondo son constantes y la contribución de esta última disminuye con el tiempo.

Las ecuaciones utilizadas para transformar las señales eléctricas en resultados numéricos son las planteadas por Roe y Toni, las que expresan:

$$i = \frac{nFAiC}{P} v\phi/e$$

donde:

i : altura de pico, μamp .

n : No. de electrones

F : Constante de Faraday ²

A : Area del electrodo, cm^2

l : Grosor de la capa de mercurio, cm

C : Concentración del metal en la capa
de mercurio

v : Velocidad de Barrido, mV/seg

$\phi = nF/RT = 0.039n$, mV a 25°C

$e = 2.7182$

lo que se puede simplificar a:

$$i = \frac{KCv}{P R}$$

y la segunda:

$$E = E' + 2.36 \log \frac{i}{i_0}$$

donde:

E_p : Pico de Potencial

d : grosor de la capa de difusión, cm

E^0 : Potencial Formal del Metal

D : Coeficiente de difusión del ión metálico en solución

2.3.- CELDA DE TRABAJO.

Los electrodos de capa de mercurio sobre sustratos de metal o grafito se han desarrollado y usado por muchos años. Estos incrementan significativamente los picos de potencial a concentraciones determinadas del metal de interés.

Las técnicas de redisolución escalonada y pulso (reducen el efecto de corriente capacitiva) y de pulso diferencial (elimina algunos de los efectos de la corriente remanente o background), son las utilizadas para la determinación de metales por redisolución.

La celda de trabajo está compuesta por tres electrodos: Un electrodo de trabajo de grafito pirolítico cristalino recubierto por una capa de mercurio, de rápida respuesta; un electrodo de referencia de Ag/AgCl inmerso en solución saturada de cloruro de sodio y un electrodo auxiliar de platino, que provee de corriente en el paso de depositación, la localización de este directamente en la solución es necesaria, por que la corriente requerida en algunos casos no puede ser provista por la resistencia de los puentes salinos convencionales.

Este sistema cumple con dos pasos fundamentales en la etapa de depositación:

a) Obtención de una gran parte de material electroactivo en solución, con lo que se eliminan errores por depositaciones no uniformes entre cada muestra.

b) Reducción de una fracción significativa del O_2 y otros ² materiales electroactivos en la celda, con lo que se reduce notablemente la señal de fondo y se elimina la necesidad de degasificar la muestra.

Estas condiciones interactúan en el caso en que el O_2 ² tarde la depositación de algunas especies en ciertas matrices, la rápida adquisición de fracciones significativas del material electroactivo de interés disminuyen el error producido por este efecto.

2.4.- PRINCIPIO DE OPERACION.

Los metales electroactivos de la muestra son concentrados en la capa de mercurio sobre el electrodo durante la parte inicial del ciclo de análisis, cuando el electrodo de trabajo ejerce el potencial inicial. El uso de un motor de agitación en esta etapa y el tamaño del electrodo incrementan la eficiencia del proceso y disminuye considerablemente el tiempo de análisis.

Al concentrarse la mayor parte del metal bajo estudio, se aplica un potencial final, mediante una rampa anódica escalonada con pasos de 10 mseg. de duración, que provoca la rápida remoción de éste del electrodo y se registra la corriente resultante.

El área del pico resultante, obtenida por integración electrónica de las corrientes de redisolución capacitiva y faradaica, es analizada matemáticamente (ecuación de Roo-Toni), con lo que se produce una medida cuantitativa del metal presente.

III.- PARTE EXPERIMENTAL.

1.- MATERIALES Y REACTIVOS

1.1.-PREPARACION DE LOS REACTIVOS.

1.- SOLUCION DE ACETATO DE PLOMO (II).

Se pesaron 758 mg. de acetato de plomo (II) (Baker), en una balanza analítica Bosch Mod. 2000, se colocaron en un matraz volumétrico de 1000 ml. y se aforó con agua deionizada hasta la marca. [Concentración final: 2 mM (115 ppm)].

2.- SOLUCION DE ACETATO DE SODIO.

Se pesaron 272 mg. de acetato de sodio (Baker), en balanza analítica y se agregó el agua deionizada necesaria hasta 1000 ml. (Concentración final: 2mM)

3.- SOLUCION ANTIOXIDANTE.

Se pesaron 100 mg. de metabisulfito de sodio (Merck), se disolvieron en aproximadamente 50 ml. de agua deionizada, se agregaron 0.45 ml de ácido perclórico suprapur (Merck) y se aforó a 100 ml. con agua deionizada.

4.- FASE MOVIL.

Se pesaron 320 mg. de EDTA (Prods. Químicos Monterrey), 900 mg. de octilsulfato de sodio (Sigma) y 8 g. de fosfato dibásico de potasio (Merck), se disolvieron en 500 ml. de agua HPLC (Cromasol) con agitación magnética, se ajustó el pH a 3.1 con ácido fosfórico suprapur (Merck), con un potenciómetro Metrohm mod. 656 pH-meter, se añadieron 300 ml. de metanol HPLC (Merck) y se aforó a 2000 ml. con agua HPLC.

1.2.- PREPARACION DE LOS ESTANDARES.

1.- ACIDO DIHIDROXIFENILACETICO. (DOPAC)

Se pesaron 10 mg. del ácido dihidroxifenilacético libre (Sigma) y se llevaron a 100 ml. con solución antioxidante. (Concentración final: 100 µg/ml)

2.- NORADRENALINA. (NA)

Se pesaron 18.9 mg de bitartrato de noradrenalina (Sigma), se añadió solución antioxidante en cantidad suficiente para 100 ml. (Concentración final: 100 µg/ml)

3.- ACIDO 5-HIDROXIINDOLILACETICO. (5-HIAA)

Se pesaron 10 mg. del ácido 5-hidroxiindolilacético libre (Sigma) y se aforaron a 100 ml. con solución antioxidante. (Concentración final: 100 µg/ml)

4.- ACIDO HOMOVAINILILICO. (HYA)

Se pesaron 10 mg. del ácido homovainililico libre (Sigma), se adicionó la solución antioxidante necesaria para 100 ml. de solución. (Concentración final: 100 µg/ml)

5.- DOPAMINA (DA)

Se pesaron 11.9 mg de clorhidrato de dopamina (Sigma) y se disolvieron en el volumen necesario de solución antioxidante para tener 100 ml. (Concentración final: 100 µg/ml)

6.- SEROTONINA (5-HT)

Se pesaron 12 mg. de clorhidrato de serotonina (Sigma) y se

llevaron a 100 ml. con solucibn antioxidante. (Concentracibn final: 100 μ R/ml)

1.3.-REACTIVOS METEXCHANGE. (ESA)

1.- SOLUCION REACTIVA M.

Contiene: Cloruro de Cromo 1.07 %/peso; Acetato de Calcio 1.43 %/peso; Ibn Mercurico 0.0028 %/peso; Acido Nitrico 0.1 N; Buffer y agente tensoactivo.

2.- ESTANDAR BAJO.

Contiene: Cloruro de Cromo 1.03 %/peso; Acetato de Calcio 1.38 %/peso; 0-10 ng. de plomo y 100 μ l. de sangre humana entera sonificada en solucibn acuosa.

3.- ESTANDAR ALTO.

Contiene: Cloruro de Cromo 1.03 %/peso; Acetato de Calcio 1.38 %/peso; 100 +/- 10 ng. de plomo y 100 μ l. de sangre humana entera sonificada en solucibn acuosa.

4.- SOLUCION PLATEADORA.

Reactivo M adicionado con 0.096 %/p de Ibn Mercurico.

1.4.- MATERIAL BIOLÓGICO.

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho cepa Nistar con peso inicial de 150-200 g.

1.5.- LAVADO DE MATERIAL.

El material fue lavado sucesivamente con detergente, ácido nítrico diluido y enjuagado repetidas veces con agua deionizada.

II.- ADMINISTRACION DEL PLOMO.

El plomo fue administrado a los grupos experimentales como soluci3n bebible de acetato de plomo (II) en concentraci3n 2 mM por un periodo de 15 d1as.

Los grupos control fueron tratados con soluci3n bebible de acetato de sodio en concentraci3n 2mM a lo largo de 15 d1as.

Los animales tuvieron acceso libre a comida y agua y un regimen de luz normal.

III.- OBTENCION DEL TEJIDO.

Pasados los 15 d1as del tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitaci3n, extrayendose el cerebro.

Se diseccionaron sobre hielo las 8 regiones cerebrales siguientes: Cerebelo, Corteza, Cuerpo estriado, Hipocampo, Hipotalamo, Mesencefalo, Puente y Talamo. Tomandose adem1s una muestra de sangre del tronco, a la que se a1ad1o 0.1 ml. de heparina (Abbott) como anticoagulante.

IV.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

4.1.- PARA LA DETERMINACION DE MONOAMINAS Y METABOLITOS.

Despu1s de la disecci3n el tejido fue pesado en balanza anal1tica y posteriormente homogenizado con volúmenes variables de soluci3n antioxidante de acuerdo con el peso del tejido. Se rompi3 el tejido por medio de ultrasonido con un sonicador Lab Line Ultra manteniendose las muestras en hielo.

Las muestras se centrifugaron a 15000 rpm por 10 min. en una centrifuga Beckman mod. J-21C, se tom3 el sobrenadante y se filtr3 a través de filtros Millipore de 0.45 μ m. Las muestras

se guardaron congeladas en tubos forrados con papel aluminio para evitar la fotodescomposicibn, hasta su anblisis cromatografico.

4.2.- PARA LA DETERMINACION DE PLOMO EN SANGRE.

Se mantuvieron las muestras heparinizadas en refrigeracion (4 C) hasta el momento del analisis.

V.- ANALISIS.

5.1.- CUANTIFICACION DE MONOAMINAS Y METABOLITOS POR HPLC.

a).- CONDICIONES NORMALES DE OPERACION.

CROMATOGRAFO.

DETECTOR.

- Vel. flujo: 1.5 ml/min.
- Presibn: Maxima 400 KPa.
- Columna: C18-Fase Inversa de 15 cm. y 3 μ m. de dia metro de particula.
- Tiempo de corrida: 25 min.
- Voltaje: 0.8 V vs Ag/AgCl.
- Int. Corriente (I): 5 nA.
- E. Trabajo: Carbono vitreo.
- E. Referencia: Ag/AgCl.
- E. Auxiliar: Au.

b).- PROCEDIMIENTO.

Las monoaminas se analizaron de acuerdo con el mtodo descrito por Saligaut y colaboradores. Se utilizb el mtodo de estandarizacibn externa para la cuantificacibn de monoaminas y metabolitos. Se prepararon soluciones conteniendo 20, 40, 80 y 160 ng/ml de las monoaminas y sus metabolitos, colocando en matraces aforados de 250 ml., 50, 100, 200 y 400 μ l. de los estandares preparados previamente para DOPAC, NA, 5-HIAA, HVA, DA y 5-HT, llevandose al volumen con agua delonizada.

Se inyectaron 20 μ l. de cada una de las soluciones en un cromatografo de lquidos de alta resolucin Perkin-Elmer mod. LC 250, con detector electroquimico Metrohm mod. 656 y un integrador Perkin- Elmer Sigma 10.

Se procedi de igual manera con las muestras problema, obteniendose los cromatogramas respectivos. Los picos se identificaron con los tiempos de retencin de los estndares.

5.2.- CUANTIFICACION DE PLOMO EN SANGRE.

a).- CONDICIONES NORMALES DE OPERACION.

Potencial inicial: -1.080 ± 0.005 V.

Potencial final: -0.130 ± 0.005 V.

Velocidad de barrido: 14.00 ± 0.05 mV/paso.

Punto de ajuste del graficador: -0.700 ± 0.005 V.

Punto de ajuste del integrador: -0.500 ± 0.005 V.

Tiempo de anlisis: 1 minuto.

Expansin de escala: x 1.

Freno del barrido: Encendido.

Blanco: (-)

Cuenta: 12

b).-PROCEDIMIENTO.

Se tomaron 100 μ l. de sangre entera homogenizada en vortex (Mod. Genie 2 Lab Line), se adicionaron a un tubo que contenfa 2.9 ml. de reactivo M, se homogeniz por inversin, se colocb en la celda del Analizador de Metales Traza ESA Mod. 3010 A y se corrib el programa de anlisis. Este esta constituido por un periodo con duracin de un minuto, en el que se aplica un

potencial negativo que permite la electrodepositación del plomo que se encuentra en solución, este paso se efectúa bajo agitación constante. En el siguiente periodo de 35 segundos se ejerce un potencial positivo que permite la redisolución del metal depositado. En este momento se genera un pico de potencial que es directamente proporcional a la concentración de la especie de interés.

Las lecturas obtenidas fueron referidas a los estándares de calibración que provee el fabricante del equipo.

VI.- ESTUDIO CONDUCTUAL.

Los animales fueron divididos en 2 grupos, a uno de los cuales se le administró acetato de plomo (II) por vía oral (grupo experimental) y al otro se le administró acetato de sodio (grupo control) por un periodo de 15 días. Al término de los cuales, se les administró p-cloroamfetamina en dosis de 5 mg/kg por vía intraperitoneal. Se observó la conducta serotoninérgica de los animales por 60 minutos, registrándose por un minuto en periodos de 10 minutos, iniciándose el estudio a los 10 minutos de administrado el fármaco.

La conducta serotoninérgica fue registrada utilizando el método de Dickinson y col. (1984), en el que las ratas fueron observadas durante periodos continuos por un minuto. Observándose en cada periodo respuestas conductuales intermitentes que fueron calificadas con una escala de 0 - 4, interpretándose de la siguiente manera:

Para las conductas: Head Weaving (HW), Forepaw treading (FT) y Straub Tail (ST): 0 - ausente; 1 - presente una vez; 2 -

presente varias veces; 3 - presente frecuentemente y 4 - presente continuamente.

Para las conductas: Hindlimb Abduction (HA), Tremor (T) y Flat Body Posture (FBP): 0 - ausente; 1 - perceptible; 2 - dbbil; 3 - medio y 4 - máximo.

Las respuestas Head and Body Shakes (HBSH) se cuantificaron como frecuencia observada durante el periodo de registro.

Se registró la conducta durante 6 periodos y la puntuación máxima por conducta fue de 24 puntos.

IV.- RESULTADOS.

4.1.- NIVELES DE PLOMO EN SANGRE.

Sé ha observado que a concentraciones elevadas de plomo en sangre hay cambios significativos en la neuroquímica cerebral, por lo que la determinación de la concentración de plomo en sangre de ratas tratadas por 15 días, con solución oral de acetato de plomo (II) 2 mM, nos indicó que al elevarse los niveles de manera significativa ($p < 0.005$) (Tabla No. 3), podrían observarse cambios en los niveles de monoaminas y sus metabolitos. Estos resultados se muestran en la Figura No. 1.

NIVELES DE PLOMO EN SANGRE

CONTROL
($\mu\text{g/dL}$)

TRATADO
($\mu\text{g/dL}$)

1.0000 + 0.0100

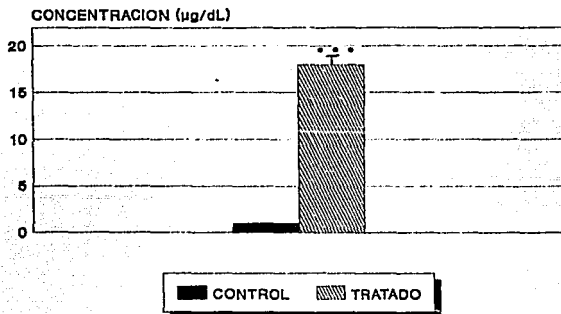
18.0000 + 0.9865

* * *

n=8

Tabla No. 3.- Niveles de plomo en sangre de ratas tratadas por vía oral con solución de acetato de plomo (II), análisis efectuado por voltimetría de redisolución anódica. Los resultados se expresan como el promedio y error estándar de n=8 experimentos independientes. Prueba t de Student. ***, $p < 0.005$.

NIVELES DE PLOMO EN SANGRE



n=8

FIGURA No. 1.- Niveles de plomo en sangre de ratas tratadas por vía oral con solución de acetato de plomo (II) 2mM por 15 días, analizados por Voltimetría de Redisolución Anódica. Los resultados se expresan como el promedio y error estándar de n=8 experimentos independientes. Prueba t de Student. ***, $p < 0.005$.

4.2.- CONCENTRACION DE MONOAMINAS Y METABOLITOS.

a) SEROTONINA (5-Ht).

Al cuantificarse las concentraciones de serotonina en 8 regiones del cerebro de ratas, se encontró que había aumento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de 5-Ht en el tálamo.

En la Tabla No. 4 y Figura No. 2 se presentan los resultados de este análisis.

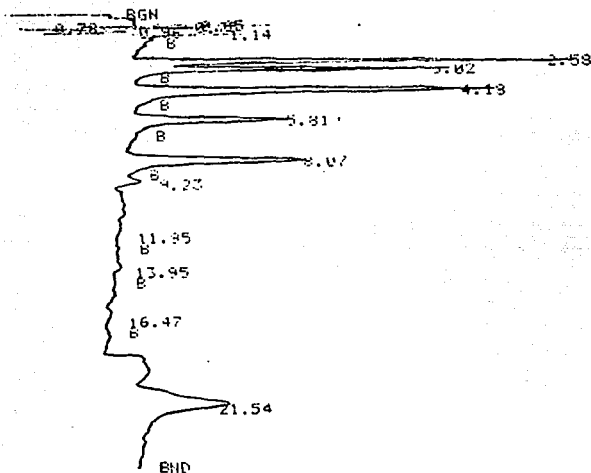
b) ACIDO 5-HIDROXIINDOLILACETICO (5-HIAA).

En la Figura No. 3 se muestran únicamente los resultados con significancia estadística para la determinación de 5-HIAA en regiones cerebrales de rata. En la figura se puede observar que hubo disminución generalizada en la concentración regional de 5-HIAA (Tabla No. 5), siendo el Hipotálamo la región que observa cambio más significativo ($p < 0.005$), seguida por Hipocampo y Mesencefalo que son igualmente significativas ($p < 0.025$) y finalmente por Cuerpo Estriado con significancia de $p < 0.05$.

INST 1 METH 1 FILE 13

RUN 6

SENSITIVITIES 200 20



ESQUEMA No. 4.- Representación de un cromatograma típico para la cuantificación de monoaminas y metabolitos, utilizando la técnica descrita por Salgaut y colaboradores. (1986). La identificación se llevó a cabo con ayuda de los tiempos de retención. DOPAC: 2.60 min; NA: 3.00 min; 5-HIAA: 4.20 min; HVA: 5.80 min; DA: 6.20 min; 5-HT: 22.00 minutos. (Tiempos aproximados)

CONTENIDO DE SEROTONINA EN REGIONES

REGION	CONTROL ($\mu\text{g/g}$ tejido)	TRATADO	SIGNIF.
HIPOTALAMO	0.2366 + 0.0614	0.2225 + 0.1316	N.S
C. ESTRIADO	0.3917 + 0.0870	0.5338 + 0.0805	N.S
PUENTE	0.1513 + 0.0194	0.1515 + 0.0458	N.S
TALAMO	0.1266 + 0.0237	0.1933 + 0.0274	*
MESENCEFALO	0.1888 + 0.0368	0.2147 + 0.0636	N.S
HIPOCAMPO	0.0471 + 0.0141	0.0215 + 0.0072	N.S
CEREBELO	0.1045 + 0.0016	0.1121 + 0.0129	N.S
CORTEZA	0.1589 + 0.0139	0.1495 + 0.0147	N.S

n=6

TABLA No. 4.- Efecto de la ingesta de plomo sobre los niveles de Serotonina (5-Ht) en tálamo de ratas tratadas subagudamente con acetato de plomo (II). Análisis realizados por Cromatografía de Líquidos de Alta resolución (HPLC). Los resultados se expresan como el promedio y error estándar de n=6 experimentos independientes. Prueba t de Student. *, $p < 0.05$.

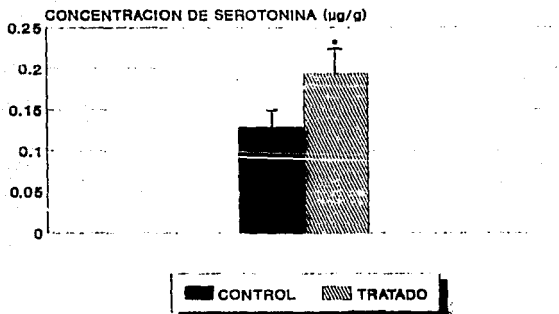
CONTENIDO DE 5-HIAA EN REGIONES

REGION	CONTROL ($\mu\text{g/g}$ tejido)	TRATADO	SIGNIF.
HIPOTALAMO	0.3974 + 0.0590	0.2701 + 0.0333	• • •
C. ESTRIADO	0.3560 + 0.0450	0.1297 + 0.0084	•
MESENCEFALO	0.2732 + 0.0170	0.1551 + 0.0089	• •
HIPOCAMPO	0.1260 + 0.0385	0.0192 + 0.0019	• •
PUENTE	0.1714 + 0.0379	0.1369 + 0.0392	N.S
TALAMO	0.2178 + 0.0378	0.1738 + 0.0205	N.S
CEREBELO	0.0638 + 0.0003	0.0431 + 0.0001	N.S
CORTEZA	0.1224 + 0.0162	0.1110 + 0.0185	N.S

n=6

TABLA No. 5.- Comparación de los niveles regionales cerebrales de Acido 5-Hidroxiindolilacético (5-HIAA), de ratas intoxicadas subagudamente con solución oral de acetato de plomo (II). Los resultados se expresan como el promedio y error estándar de n=6 experimentos independientes. Prueba t de Student. +, $p < 0.05$; **, $p < 0.025$; ***, $p < 0.005$.

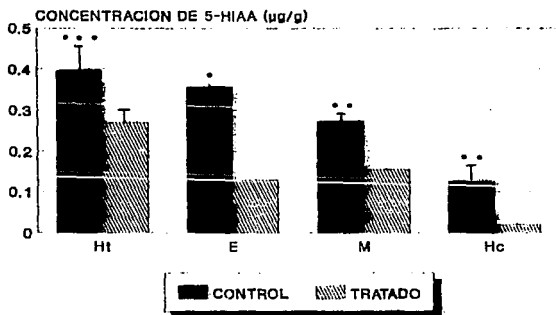
PLOMO Y MONOAMINAS SEROTONINA



n=6

FIGURA No. 2.- Efecto de las ingestas de plomo sobre el nivel de Serotonina en tálamo de ratas intoxicadas subagudamente con acetato de plomo (II), análisis realizado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Los resultados se expresan como el promedio y error estándar de n=6 experimentos independientes. Prueba t de Student. *, $p < 0.05$.

PLOMO Y MONOAMINAS 5-HIAA



n=6

FIGURA No. 3.- Comparación del efecto de la ingesta subaguda de plomo sobre los niveles regionales de Acido 5-Hidroxiindolilacético. El análisis se realizó por HPLC. Ht: Hipotálamo; E: Cuerpo Estriado; M: Mesencéfalo; Hc: Hipocampo. Los resultados se expresan como el promedio y error estándar de n=6 experimentos independientes. Prueba t de Student.

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.026$; ***, $p < 0.005$.

4.3.- ESTUDIO CONDUCTUAL.

En la Tabla No. 6 y Figuras Nos. 4-8 se presentan los componentes observados del síndrome serotoninérgico.

En cada una de las gráficas se puede observar que el puntaje obtenido por los animales tratados con plomo aumenta considerablemente con respecto a los animales control.

Los resultados que se muestran son estadísticamente significativos, los componentes Body and Head Shakes y Flat Body Posture tuvieron significancia de $p<0.001$; el componente Tremor presentó significancia de $p<0.01$ y los componentes Forepaw Treading y Hind Limb Abduction fueron significativos con $p<0.05$.

Los componentes Straub Tail y Head Weaving no se observaron en los tiempos de registro ni en los animales control, ni en los tratados con plomo, por lo que no fueron tomados en cuenta para la determinación del síndrome serotoninérgico.

CONDUCTA SEROTONINERGICA

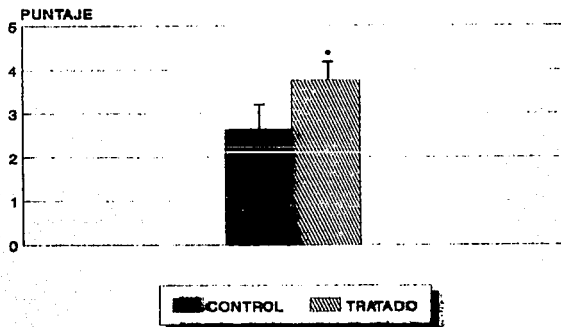
COMPONENTE	CONTROL	TRATADO	SIGN.
	(puntaje)		
FOREPAW TREADING	2.6250 + 0.5957	3.7500 + 0.4119	*
HINDLIMB ABDUCTION	2.1250 + 0.5489	3.5000 + 0.6268	* *
TREMOR	1.6250 + 0.3239	2.6250 + 0.2630	* *
BODY/HEAD SHAKES	24.8750 + 5.7708	44.2500 + 3.7261	***
FLAT BODY POSTURE	6.1250 + 0.4795	10.3750 + 0.6437	***

n=8

TABLA No. 6.- Evaluación de la conducta serotoninérgica inducida por p-Cloroamfetamina, en ratas tratadas con solución de acetato de plomo (II) 2mM por vía oral. Los resultados se expresan como el promedio y error estándar de n=8 experimentos independientes. Prueba Suma de Rangos de Wilcoxon.

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

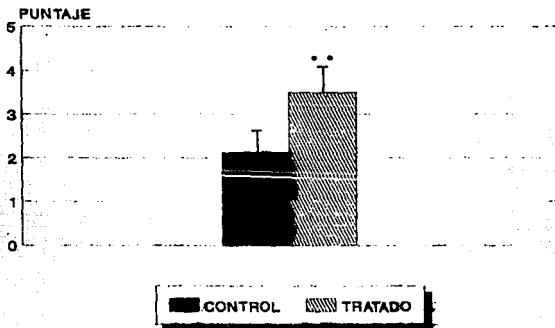
PLOMO Y CONDUCTA SEROTONINERGICA FOREPAW TREADING



n=8

FIGURA No. 4.- Efecto del plomo sobre el componente del síndrome serotoninérgico FOREPAW TREADING, inducido con p-clororramfetamina. Los resultados se expresan como el promedio y error estándar de n=8 experimentos independientes. Prueba Suma de Rangos de Wilcoxon. *, $p < 0.05$.

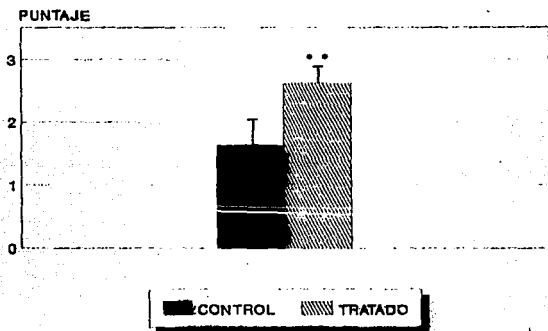
PLOMO Y CONDUCTA SEROTONINERGICA HINDLIMB ABDUCTION



n=8

FIGURA No. 5.- Efecto del plomo sobre el componente del síndrome serotoninérgico HIND LIMB ABDUCTION, inducido con p-cloroamfetamina. Los resultados se expresan como el promedio y error estándar de n=8 experimentos independientes. Prueba Suma de Rangos de Wilcoxon. *, $p < 0.05$.

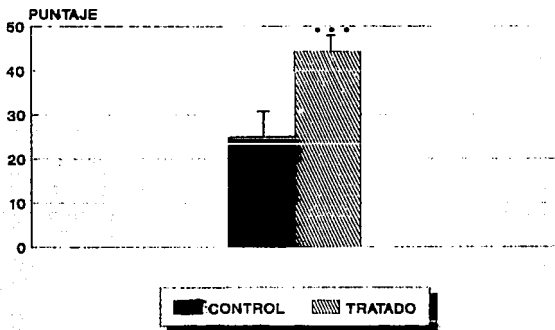
PLOMO Y CONDUCTA SEROTONINERGICA TREMOR



n=8

FIGURA No. 6.- Efecto del plomo sobre el componente del síndrome serotoninérgico TREMOR, inducido con p-cloroamfetamina. Los resultados se expresan como el promedio y error estándar de n=8 experimentos independientes. Prueba Suma de Rangos de Wilcoxon. **, $p < 0.01$.

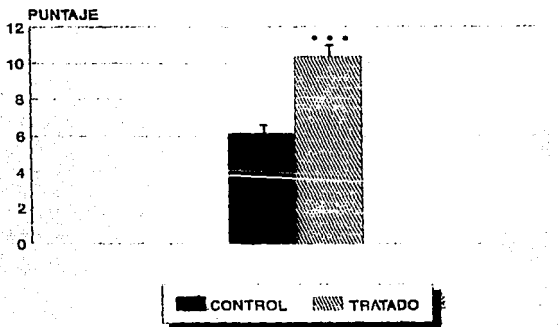
PLOMO Y CONDUCTA SEROTONINERGICA BODY AND HEAD SHAKES



n=8

FIGURA No. 7.- Efecto del plomo sobre el componente del síndrome serotoninérgico BODY AND HEAD SHAKES, inducido con p-cloroamfetamina. Los resultados se expresan como el promedio y error estándar de n=8 experimentos independientes. Prueba Suma de Rangos de Wilcoxon. ***, $p < 0.005$.

PLOMO Y CONDUCTA SEROTONINERGICA FLAT BODY POSTURE



n=8

FIGURA No. 8.- Efecto del plomo sobre el componente del síndrome serotoninérgico FLAT BODY POSTURE, inducido con p-cloroamfetamina. Los resultados se expresan como el promedio y error estándar de n=8 experimentos independientes. Prueba Suma de Rangos de Wilcoxon. ***, $p < 0.005$.

V.- DISCUSION DE RESULTADOS.

La diferencia significativa en los niveles de plomo en sangre y los cambios en los niveles de serotonina y su metabolito indican la facilidad del paso de este a través de la barrera hematoencefálica, esto puede deberse a la competencia existente entre el plomo y otros cationes divalentes como Ca^{2+} , y al mecanismo de transporte de estos últimos.

Se observó disminución en la concentración del metabolito 5-HIAA, en las siguientes regiones: Hipocampo, Hipotálamo, Cuerpo Estriado y Mesencéfalo, así mismo se encontró elevado en Tálamo el nivel del neurotransmisor 5-Ht, de los animales tratados con solución de plomo, lo que nos indica que posiblemente el plomo impide la liberación de la serotonina presináptica al espacio sináptico, lo que explicaría el aumento de esta, y al no liberarse de manera normal, disminuye su metabolismo, lo que podría generar el cambio en la concentración de su metabolito observado en este trabajo.

De acuerdo a los componentes observados en la evaluación del síndrome serotoninérgico, al disminuir la liberación de la serotonina presináptica, el plomo permite que la p-cloroamfetamina libere 5-Ht de la presinápsis, la cual se une a sus receptores específicos, produciendo los componentes del síndrome serotoninérgico más marcados que en los animales control, en los que se supone la transmisión serotoninérgica no está modificada. Esto sugiere que el efecto del plomo podría estar relacionado con un incremento de la respuesta pos-sináptica a la serotonina en los animales administrados con plomo.

VI.- CONCLUSIONES.

Conforme a los datos presentados en este trabajo, se observaron cambios en el sistema serotoninérgico cerebral, ocasionados por la intoxicación subaguda por plomo a niveles bajos.

La elevación de los niveles de plomo posiblemente inhibe la liberación y/o potencia la recaptura de serotonina y por lo tanto afecta marcadamente la transmisión serotoninérgica.

El plomo, al inhibir la liberación de serotonina, puede inducir una hipersensibilidad en los receptores a 5-Ht, produciendo una respuesta exagerada cuando se administra la p-cloroamfetamina. Esta puede ser una de las causas que ocasionan los cambios de comportamiento en los individuos con niveles elevados del metal.

Para confirmar estos efectos debe realizarse un estudio conductual en animales intoxicados con plomo a los que se les administrará un agonista de serotonina, como quipazina, con lo que se observarán los componentes del síndrome serotoninérgico más marcados, debido a la acción de este agonista sobre los receptores serotoninérgicos.

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

Aungst B.J. and Fung Ho-Leung. (1985). The effects of dietary calcium on lead absorption, distribution, and elimination kinetics in rats. J. Toxicol. Environ. Health. 16, 147-159.

Bard A.J. and Faulkner L.R. pags. 370-373 y 406-420 en Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications. (1980). John Wiley and sons.

Bhattacharyya G.K. and Johnson Richard. pags. 507-519 en Statistical Concepts and Methods. (1977). John Wiley and sons.

Brennan M.J. and Cantwill R.C. (1979). Delta aminolevulinic acid is a potent agonist for GABA autoreceptors. Nature. 280, 514-515.

Bull R.J., Lutkenhoff S.D., McCarty G.E., and Miller R.G. (1979). Delays in the postnatal increase of cerebral cytochrome concentrations in lead exposed rats. Neuropharm. 18, 83-92.

Claeys-Thoreau F., Thiessen L., Bruaux P., Ducoffre G. and Verduyn G. (1987). Assesment and comparision of human exposure to lead between Belgium, Malta, Mexico, and Sweden. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 59, 31-41.

Cooper J.R, Bloom F.E, and Roth R.H. Pags. 89-199 en The Biochemical Basis of Neuropharmacology. (1982). Oxford University Press.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Dickinson S.L., Andrews C.D. and Curzon G. (1984). The effects of lesions produced by 5,7-dihydroxytryptamine on 5-hydroxytryptamine-mediated behaviour induced by amphetamine in large doses in the rat. *Neuropharmacology*. 23, 423-429.

Dickinson S.L. and Curzon G. (1986). 5-hydroxytryptamine-mediated behavior in male and female rats. *Neuropharmacology*. 25, 771-776.

Drew C., Sponce I., and Johnston G. (1989). Effects of lead salts on the uptake, release, and binding of gamma aminobutyric acid: the importance of buffer composition. *J. Neurochem.* 52, 433-440.

Fernandez-Guasti A., Escalante A., Hong E., and Agmo A. (1990). Behavioural actions of the serotonergic anxiolytic indorenate. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, 83-88.

Komulainen H., Pietarinen R., and Tuomisto J. (1983). Increase in dopamine uptake in rat striatal synaptosomes after an acute *In Vivo* administration of organic and inorganic lead. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 52, 381-389.

Krstulovic A.M. and Brown P.R. Pags. 32-132, en *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. Theory, Practice, and Biomedical Applications*. John Wiley and sons. (1982).

Lasley S.M., Greenland R.D., Minnema D.J. and Michaelson I.A. (1984). Influence of chronic organic lead exposure on regional dopamine and 5-hydroxytryptamine turnover in rat brain. *Neurochem. Res.* 9, 1675-1688.

Markovac J., and Goldstein G.W. (1988). Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein Kinase C. *Nature*. 334, 71-73.

Meredith P., McIntosh M.J., Petty M.A., and Reid J.L. (1988). Effects of lead exposure on rat brain catecholaminergic neurochemistry. *Comp. Biochem. Physiol.* 89C, 215-219.

Patel A.J. (1974). The metabolism of ¹⁴C-glucose by the brains of suckling rats intoxicated with inorganic lead. *J. Neurochem.* 22, 581-590.

Peroutka Stephen J. Serotonin Receptors. Pags. 303-311 en Meltzer Herbert Y. (ed). *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress.* (1987).

Peroutka Stephen J. (1988). 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular, biochemical and physiological characterization. *TINS* 11, 496-500.

Ramsay P.B., Kringman M.R., and Morrel P. (1980). Developmental studies of the uptake of choline, GABA, and dopamine by crude synaptosomal preparations after in vivo or in vitro lead treatment. *Brain Res.* 187, 383-402.

Saligaut, C., Chretien, P., Daoust. M., Moore, N., and Boismare, F. (1986). Dynamic characteristics of Dopamine, Norepinephrine and Serotonin metabolism in axonal endings of rat hypothalamus and striatum during hipoxia: a study using HPLC with electrochemical detection. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 8, 343-349.

Silbergeld E.K., and Lanon J.M. (1980). Role of altered Hemo synthesis in lead neurotoxicity. J. Occup. Med. 22, 680-684.

Silbergeld E.K., Miller L.P., Kennedy S., and Eng N. (1979). Lead, GABA and seizures: Effects of subencephalopathic lead exposure on seizure sensitivity and gabaergic function. Environ. Res. 19, 371-382.

Stewart C.H. Metales Pesados. Pags. 784-788, en Goodman L.S. y Gilman A.(eds). Bases Farmacologicas de la Terapeutica. (1978). Ed. Nueva Interamericana.

Sundstrom R., Muntzing K., Kalimo H., and Sourander P. (1985). Changes in the integrity of the blood-brain barrier in suckling rats with low dose lead encephalopathy. Acta Neuropathol. 68, 1-9.

Tsung-Ming Shih and Hanin I. (1978) Chronic lead exposure in immature animals: Neurochemical correlates. Life Sci. 23, 877-888.

Walsh T.J., etal (1986). Acute exposure to triethyl lead enhances the behavioural effects of dopaminergic agonists: Involvement of brain dopamine in organolead neurotoxicity. Brain Res. 363, 222-229.