

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA MEDICIÓN DE
CATECOLAMINAS EN ORINA DE ADULTOS MAYORES COMO
MARCADOR BIOLÓGICO EN LA DETERMINACIÓN
DE LA CARGA ALOSTÁTICA**

Silvia Benavides Varela

CARTAGO, 2005

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA MEDICIÓN DE CATECOLAMINAS EN ORINA DE ADULTOS MAYORES COMO MARCADOR BIOLÓGICO EN LA DETERMINACIÓN DE LA CARGA ALOSTÁTICA

Silvia Benavides Varela*

RESUMEN

La estandarización de un protocolo confiable para la medición de catecolaminas en orina de adultos mayores se realizó en el marco del Estudio de Longevidad y Envejecimiento Saludable (CRELES) que realiza en Costa Rica el Centro Centroamericano de Poblaciones y el Instituto de Investigaciones en Salud, como parte de la batería de pruebas necesarias para la determinación de la carga alostática en personas mayores de 60 años. Este protocolo se desarrolló en el Programa de Investigación en Neurociencias de la Universidad de Costa Rica, incluyó la estandarización de los procesos de colecta, análisis, y manejo de la muestra de orina. Se evaluó la variación en la concentración de las catecolaminas según el preservante utilizado durante la colecta, y se demostró que no existen diferencias significativas en los tratamientos ($\alpha > 0.05$). El procedimiento de extracción en fase sólida propuesto en el kit de la casa comercial Bioanalytical Systems, no produjo los resultados esperados de recuperación de las sustancias, razón por la que se realizaron algunas modificaciones al protocolo que incluyeron la disminución de la velocidad de elución (0,1ml/min) y de la cantidad del eluyente colectado (0,5ml). Se incorporaron además modificaciones en el flujo de inyección (1,5ml/min) y la temperatura de la columna analítica (28°C) como consecuencia de los resultados obtenidos en pruebas realizadas. Se mantuvo el potencial de 600mV sugerido en el manual del kit, aunque se varió la intensidad de corriente aplicada (10nA en los primeros 15 minutos y 20nA en lo sucesivo de la corrida). Finalmente se validó el método, al probar que este resulta repetible ($CV < 20\%$), exacto ($> 97.5\%$), lineal ($r^2 > 0.9882$) y reproducible entre los días, y que tanto las muestras como los calibradores se mantienen estables durante el período requerido para el análisis. Las pruebas piloto realizadas a 15 individuos confirmaron la efectividad del método estandarizado y su utilidad para la medición de epinefrina y norepinefrina en orina de adultos mayores; se amplió además el potencial de aplicación del método, pues se logró también la estandarización para la detección de dopamina en orina.

* Informe de Trabajo Final de Graduación, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2005

**ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA MEDICIÓN DE CATECOLAMINAS EN
ORINA DE ADULTOS MAYORES COMO MARCADOR BIOLÓGICO
EN LA DETERMINACIÓN DE LA CARGA ALOSTÁTICA**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**Miguel Rojas Chávez, PhD
Profesor Asesor**

**Jaime Fornaguera Trías, PhD
Asesor externo**

**Xinia Fernández Rojas, PhD
Lectora**

DEDICATORIA

*A papi
por su trabajo incansable y
por su ejemplo de paciencia y escucha.*

*A mami
por su preocupación constante
y su dedicación completa a nosotros sus hijos.*

*A los dos gracias,
por su apoyo incondicional
y por ser mi inspiración en gran parte
de mis retos personales.
Gracias también por estar a mi lado siempre.*

AGRADECIMIENTOS

La autora desea dejar constancia de su agradecimiento:

A Dios, porque en este trabajo me permitió conocer más de cerca la grandeza de sus obras y me ayudó a valorar todos los regalos que me ha dado.

A mis hermanos y hermana, por luchar junto a mí en las pequeñas adversidades que se presentaron, y por brindarme su ayuda en todos y cada uno de los momentos en que tuvieron esa oportunidad.

A mi novio, que me enseñó a vivir a plenitud mi trabajo y mis estudios, a aprender que el esfuerzo no tiene razón de ser si el fin último no es dar a los demás un poquito de mí. Por estar cerca aunque estuviéramos lejos.

Al Doctor Miguel Rojas por ofrecer su aporte profesional para la realización de este trabajo.

A la Doctora Olga Baudrit, por sus valiosos y acertados aportes técnicos durante el desarrollo del proyecto y por la colaboración desinteresada que siempre me brindó.

A la Doctora Xinia Fernández, por confiar en mí y en mi trabajo, por su comprensión y por brindar parte de su valioso tiempo no sólo a la revisión sino a la supervisión durante la realización de todo mi proyecto.

A la Master Elvira Salas, en quien encontré una nueva amiga y quien estuvo dispuesta siempre a brindarme sus conocimientos adquiridos en el laboratorio.

Al Doctor Jaime Fornaguera, por los esfuerzos realizados para hacer posible la consecución de mi trabajo, por todas las enseñanzas transmitidas en el día a día, su aliento en los momentos de desesperación y su compañía en los momentos de alegría, pero sobre todo por enseñarme que el éxito en el trabajo sólo se logra si se disfruta lo que se hace.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE ANEXOS	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Homeostasis y alostasis	4
2.2 Alostasis y carga alostática	5
2.3 Respuesta neurofisiológica al estrés	7
2.3.1 Activación autonómica	8
2.3.2 Activación neuroendocrina	10
2.4 Comunicación intercelular en el organismo.....	11
2.5 Transmisión de señales	12
2.5.1 Señalamiento neuronal	12
2.5.2 Señalamiento humoral.....	15
2.6 Catecolaminas	15
2.6.1 Definición	15
2.6.2 Biosíntesis.....	16
2.6.3 Almacenamiento.....	17
2.6.4 Liberación de catecolaminas	18
2.6.5 Norepinefrina	19
2.6.7 Los exámenes de catecolaminas en orina	21
2.7 Principio de Cromatografía de columna.....	22
2.7.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	23
2.8 Bases teóricas de la detección electroquímica	25
2.9 Principio de extracción en fase sólida.....	26
2.9.1 Interacciones moleculares en la extracción en fase sólida.....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Colecta	29
3.1.1 Determinación del refrigerante.....	29

3.1.2	<i>Determinación del preservante</i>	31
3.2	Pruebas analíticas	32
3.2.1	<i>Preparación de las sustancias empleadas en los análisis</i>	32
3.2.2	<i>Cálculo de la concentración de catecolaminas según la respuesta obtenida</i>	35
3.2.3	<i>Elaboración de las curvas de calibración</i>	35
3.3	Extracción en fase sólida (EFS)	36
3.3.1	<i>Condiciones iniciales de trabajo</i>	36
3.3.2	<i>Estabilidad de las muestras con previa EFS</i>	37
3.4	Condiciones del sistema de cromatografía	38
3.4.1	<i>Condiciones iniciales de trabajo</i>	38
3.4.2	<i>Evaluación del potencial e intensidad de corriente aplicada en la detección</i>	38
3.5	Valor estadístico del ensayo y otras condiciones	39
3.5.1	<i>Variación entre días</i>	39
3.5.2	<i>Estabilidad de los calibradores</i>	39
3.5.3	<i>Repetibilidad</i>	39
3.5.4	<i>Exactitud</i>	40
3.5.5	<i>Linealidad</i>	40
3.6	Variantes planteadas al método de trabajo	41
3.6.1	<i>Determinación del porcentaje de recuperación</i>	41
3.6.2	<i>Velocidad de elusión en el proceso de extracción</i>	41
3.6.3	<i>Cantidad de eluyente D colectado al final del proceso de EFS</i>	42
3.6.4	<i>Flujo y temperatura de la columna de separación</i>	42
3.6.5	<i>Método de calibración</i>	43
3.7	Prueba piloto	43
4.	RESULTADOS	45
4.1	Determinación del refrigerante	45
4.2	Determinación del preservante	46
4.3	Extracción en fase sólida	48
4.4	Determinación del porcentaje de recuperación	48
4.5	Velocidad de elusión en el proceso de extracción	49
4.6	Cantidad de eluyente D colectado al final del proceso de EFS	50
4.7	Estabilidad de las muestras con previa EFS	51
4.8	Evaluación del potencial e intensidad de corriente aplicada en la detección	52
4.9	Flujo y temperatura de la columna de separación	52

4.10 Método de calibración.....	54
4.11 Estabilidad de los calibradores.....	55
4.12 Variación entre días	55
4.13 Repetibilidad	56
4.14 Exactitud	56
4.15 Linealidad.....	57
4.16 Pruebas piloto.....	58
5. DISCUSIÓN	59
6. CONCLUSIONES	69
7. RECOMENDACIONES	71
REFERENCIAS	72
ANEXOS	76

ÍNDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Página
1	Condiciones de preservación de las muestras por evaluar	31
2	Concentración de las catecolaminas en los calibradores preparados	34
3	Planteamiento de evaluación de distintas intensidades de corriente y potencial de trabajo en el detector electroquímico.	38
4	Condiciones de evaluación en el aparato de medición de HPLC.	43
5	Promedio de la concentración de las catecolaminas según los tratamientos en la preservación de la muestra durante la colecta.	47
6	Diferencias en la detección de las catecolaminas según el potencial e intensidad de corriente aplicadas en el electrodo.	52
7	Tiempos de corrida de las muestras inyectadas, según el flujo y la temperatura de la columna de separación.	53
8	Promedio de la concentración de las catecolaminas en muestras inyectadas a un flujo de un mililitro/minuto, cuando se varió la temperatura en la columna de separación.	54
9	Promedio de la concentración de las catecolaminas en muestras analizadas por diferentes métodos de calibración.	54
10	Porcentaje de recuperación de la solución acuosa extraída de acuerdo con el método de integración.	55
11	Resultados obtenidos en las pruebas de repetibilidad para las distintas sustancias y según la matriz de la muestra inyectada.	56
12	Exactitud del ensayo en la medición de catecolaminas	56
13	Valores de las concentraciones de catecolaminas en 15 personas mayores de 60 años, colaboradoras en el proyecto CRELES.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Página
1	Esquema de las conexiones y respuestas autonómicas.	9
2	Esquema de la respuesta neuroendocrina al estrés.	10
3	Esquema del proceso de síntesis de neurotransmisores, empaquetamiento, liberación y unión a los receptores.	13
4	Biosíntesis de catecolaminas.	17
5	Estructura de la Norepinefrina.	19
6	Estructura de la Epinefrina.	20
7	Mecanismos mediante los que se logra la elusión de los compuestos en el proceso de extracción en fase sólida.	27
8	Diagrama del ensamblaje del recipiente para la colecta de las muestras de orina del proyecto CRELES	30
9	Diagrama de la cámara de vacío y colocación adecuada de las columnas de extracción.	37
10	Evaluación de la temperatura de muestras colectadas con distintos refrigerantes.	45
11	Evaluación de la temperatura de muestras colectadas con distintas marcas de hielo gel.	46
12	Comparación de la resolución y limpieza de los cromatogramas, según el tratamiento de colecta empleado en cada caso.	47
13	Porcentaje de recuperación en las catecolaminas según el lote de columnas empleado en la extracción en fase sólida.	49
14	Porcentaje de recuperación obtenido al variar la velocidad de elusión en el proceso de EFS.	49
15	Porcentaje de recuperación obtenido en los estándares acuosos al variar el volumen de reactivo D que se colecta al final del proceso de EFS.	50
16	Variación en la detección de las catecolaminas de las muestras de orina según la cantidad de eluyente D que se colecta al final del proceso de EFS.	51
17	Respuesta de las catecolaminas obtenida al recoger tanto el primero como el segundo mililitro del reactivo D al realizar el proceso de extracción en fase sólida en muestras de estándar acuoso.	51

Núm.	Título	Página
18	Separación de los picos en los cromatogramas y diferencias en los tiempos de retención y corrida de las soluciones, según la temperatura en la columna de separación y el flujo de inyección.	53
19	Linealidad observada en las curvas de calibración de las catecolaminas.	57

ÍNDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Página
1	Instructivo de colecta y distribución de las muestras de orina, elaborado para el proyecto CRELES-INISA	76
2	Instructivo para recepción y almacenamiento de muestras de orina del proyecto CRELES-PIN	80
3	Protocolo estandarizado para la medición de catecolaminas en orina-PIN	81
4	Hojas de registros Proyecto CRELES-PIN	87
5	Manual de colecta de muestras de orina y sangre dirigido a adultos mayores colaboradores del proyecto CRELES	90
6	Concentración de catecolaminas en orina de los adultos mayores participante en la prueba piloto, Proyecto CRELES-PIN	93
7	Resultados obtenidos en las evaluaciones de los preservantes durante el procedimiento de colecta.	94
8	Porcentaje de recuperación obtenido con los distintos lotes de columnas.	94
9	Porcentaje de recuperación obtenido al variar la velocidad de elusión en el proceso de EFS.	95
10	Porcentaje de recuperación obtenido en los estándares acuosos al variar el volumen de reactivo D que se colecta al final del proceso de EFS.	95
11	Respuesta de las muestras acuosas y de la mezcla de orina en el día uno y el día siete después de la extracción en fase sólida.	95
12	Concentración de las catecolaminas según la temperatura, flujo y estándar de calibración empleado en el análisis.	96
13	Variación diaria de la respuesta de los calibradores preparados en desde el día de evaluación uno.	96
14	Variación diaria de la concentración de las catecolaminas en las distintas de las distintas matrices.	97

1. INTRODUCCIÓN

En nuestro país, el mejoramiento en los sistemas de salud entre otros factores, ha logrado la disminución considerable de la mortalidad infantil y el aumento de la esperanza de vida al nacer (75,59 años para hombres y 79,96 años para mujeres) (Proyecto Estado de la Nación 2003).

Los resultados del Censo del año 2000 confrontados con otros censos de años anteriores, muestran cómo la población costarricense ha mostrado un aumento en el porcentaje de adultos mayores y una disminución en el porcentaje de los individuos menores de 15 años. Esta estructura poblacional es el resultado, entre otras cosas, de una mortalidad baja y estable y una fecundidad en descenso, situación que conduciría para el año 2025 (de mantenerse las tendencias según la proyección) a una estructura de población envejecida, es decir, aquella en la que el porcentaje de personas mayores de 65 años, supera el de los menores de 15 (INEC 2001).

Un indicador que refleja los cambios de la estructura por edades de la población, es la relación o razón de dependencia demográfica; ésta se define como el cociente de la población en edades económicamente dependientes (0-14 años y más de 65 años) entre la población de edades económicamente productivas (de 15 a 64 años). El supuesto básico para utilizar esta definición es que la mayoría de las personas menores de 15 y mayores de 65 años, generalmente no participan en la actividad económica y, por lo tanto, dependen de quienes están en edad productiva (15 a 64 años) (INEC 2001).

Los cambios en la razón de dependencia que se proyectan, sugieren posibles impactos económicos y sociales de importancia para la sociedad costarricense (INEC 2001).

Ante esta realidad, el Centro Centroamericano de Población (CCP) y el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) han planteado el proyecto denominado CRELES (Costa Rica: Estudio de Longevidad y Envejecimiento Saludable), que tiene como objetivo determinar la calidad de vida y longevidad de los adultos mayores costarricenses, así como los factores causales de estas variables poblacionales.

El estudio pretende establecer correlaciones entre la longevidad de los adultos mayores en Costa Rica y factores como: resultados intermedios en la salud, situación nutricional, comportamientos a lo largo de sus vidas, situación socioeconómica, condiciones de vida y apoyo familiar, el acceso, uso y gastos en la atención de la salud. Una variable importante que también se incluirá dentro de este conjunto, es la carga alostática. Visto como un indicador directo del comportamiento de la población y como un signo del riesgo de tener problemas en la salud debido a alteraciones fisiológicas, la carga alostática permite

relacionar el nivel de vida y las condiciones socio-demográficas de adultos mayores con marcadores biológicos de riesgo (McEwen 1998, Seeman *et al.* 2001, Crimmins *et al.* 2003, Seeman *et al.* 2004).

Dentro de los marcadores de riesgo biológico que forman parte de la batería de pruebas que se emplean en la determinación de la carga alostática, se encuentra la medición de epinefrina y la norepinefrina, catecolaminas que se secretan en la médula suprarrenal y que han sido catalogadas como “hormonas de estrés”, por su función en respuesta a situaciones que producen alteración nerviosa en los individuos.

En el país, se realizan las pruebas para medición de catecolaminas en el laboratorio del Hospital Nacional de Niños, aunque solamente se llevan a cabo para el diagnóstico clínico de enfermedades como feocromocitoma y no para investigación. Por esta razón es que resultaba necesario el desarrollo de un método estandarizado para uso del proyecto CRELES y que podría utilizarse en un futuro para otros estudios o trabajos de investigación. La responsabilidad del desarrollo de este protocolo, fue adquirida por el Programa de Investigación en Neurociencias.

En este protocolo, la medición de catecolaminas podría realizarse tanto en plasma como en orina; pero, debido a los constantes cambios en la concentración de estas sustancias en respuesta a diversas situaciones que el individuo experimenta, es que se prefiere la colecta nocturna de las muestras de orina durante 12 horas, al igual que lo han hecho otros investigadores (Ming-Cheng *et al.* 2000, Seeman *et al.* 2001, Seeman *et al.* 2004).

Debido a que los humanos somos generalmente más activos por la mañana, la medición nocturna sugiere una medida más basal, en la que variaciones de catecolaminas fuera del rango esperado, pueden asociarse con mayor propiedad a desordenes fisiológicos crónicos, más que a eventos específicos o esporádicos. (Ming-Cheng *et al.* 2000)

Existen varias técnicas que podrían emplearse en la medición de catecolaminas, como por ejemplo RIA (Radioinmunoanálisis), que aunque es un método muy sensible, presenta algunas desventajas en precio y cierta dificultad en cuanto al manejo de la radiactividad, ELISA (del inglés: Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) que tiene una menor sensibilidad y resulta un poco menos preciso que los otros métodos, Espectometría de masas que es un método muy preciso y sensible pero sumamente caro si no se cuenta con el equipo de medición; y finalmente HPLC (del inglés: High Performance Liquid Chromathography) que es el método seleccionado para este estudio, pues además de su especificidad y sensibilidad, proporciona más datos de interés en menor tiempo. Este método es el más utilizado en la mayor parte de los estudios de medición de catecolaminas, y también presenta la ventaja de

ser económicamente viable para el laboratorio pues ya se cuenta con el cromatógrafo de detección electroquímica necesario para el análisis.

El protocolo para medición de catecolaminas se implementó en el laboratorio del Programa de Investigación en Neurociencias (PIN) de la Universidad de Costa Rica, con el aporte económico y logístico del Proyecto CRELES.

Objetivos

El presente Trabajo Final de Graduación tiene como **Objetivo General** estandarizar un protocolo para la medición de catecolaminas en orina de adultos mayores.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Estandarizar el protocolo de colecta de las muestras de orina que se evaluarán en el proyecto CRELES.
- Normalizar el protocolo de extracción en fase sólida de las muestras de orina que se emplearán en la cuantificación de la concentración de catecolaminas.
- Validar el protocolo para la cuantificación de epinefrina, norepinefrina en orina de adultos mayores.
- Elaborar los procedimientos de operación para medición de catecolaminas del proyecto CRELES, según el formato de la documentación del manual de calidad del INISA (norma ISO 17025).
- Diseñar los instructivos para el procedimiento de colecta de la muestra de orina que serán entregados a los adultos mayores que participan en el proyecto CRELES.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Los últimos resultados que se han publicado sobre los estudios de la población en nuestro país, señalan que, el aumento en la esperanza de vida y la disminución de la tasa de natalidad y mortalidad, así como otros índices de salud pública, provocarán a mediano plazo un cambio en la estructura poblacional, caracterizado principalmente por el aumento en el número de personas que se ubican en edades avanzadas (más de 65 años) (Proyecto Estado de la Nación 2003).

En una población que tiende a envejecerse, las políticas del país, deben avocarse al mejoramiento de los sistemas de salud pública y de seguridad social, con especial atención en la calidad de vida de los adultos mayores.

Muchas y muy diversas son las enfermedades cuya incidencia aumenta en las etapas de la vejez, entre las que se mencionan con más frecuencia: la diabetes, el cáncer de colon, las enfermedades coronarias, la depresión y la hipertensión. Esta realidad exhorta a la búsqueda y obtención de diagnósticos tempranos, en los que se utilicen marcadores biológicos que revelen los primeros signos de desajustes en los sistemas fisiológicos (Seeman *et al* 2001).

Una respuesta a ésta búsqueda, es la introducción del concepto de carga alostática (AL: Allostatic load). De acuerdo con McEwen (1998), la alostasis puede definirse como la capacidad de los sistemas fisiológicos para lograr estabilidad durante los procesos de cambio de los factores externos al ser humano.

2.1 Homeostasis y alostasis

El cuerpo humano sufre cambios constantes que le permiten llevar a cabo los procesos metabólicos adecuadamente. La homeostasis, entendida como el mantenimiento del equilibrio dinámico en el organismo, que se logra por medio de mecanismos reguladores que compensan las variaciones que ocurren en el cuerpo, (Fornaguera y Gómez 2004) es el concepto que mejor describe la razón de ser de los cambios que realiza el organismo internamente.

A principios de los 90's, Bruce McEwen publicó los primeros trabajos sobre alostasis (Bonet 2004). Al igual que la homeostasis, la alostasis es un mecanismo compensatorio, pero que tiene como objetivo regular los procesos internos para adaptar el cuerpo a los cambios que ocurren como consecuencia de los factores o estímulos externos. Dicho de otra manera, es la actividad necesaria para mantener la estabilidad a través de situaciones de cambio; o el proceso activo que sirve para mantener la homeostasis (Bonet 2004). La

alostasis está medida con marcadores que no tienen rangos tan rígidos o límites críticos para la supervivencia del ser humano, como sí los tienen los índices homeostáticos (pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno) (McEwen 1998, Bonet 2004).

2.2 Alostasis y carga alostática

Cuando el cuerpo ha sido sometido por muchos años a constantes situaciones de estrés, los sistemas fisiológicos pueden comenzar a operar fuera de los ámbitos normales, o presentar una incapacidad de retornar a los rangos óptimos después de nuevas alteraciones o presiones externas (Crimmins *et al.* 2003).

El sistema nervioso autónomo, el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) y los sistemas cardiovascular, metabólico e inmunológico, protegen al cuerpo, respondiendo al estrés interno y externo; a esta respuesta es a la que se ha denominado “alostasis”. El esfuerzo adicional que realiza el cuerpo para responder adecuadamente a este estrés que se genera, es lo que se denomina “carga alostática”, y se manifiesta en el desgaste prematuro por sobreactividad crónica de los sistemas fisiológicos o por la falta de activación de los mismos (McEwen y Stellar 1993, McEwen 1998, Crimmins *et al.* 2003).

Las respuestas alostáticas más comunes comprometen al sistema nervioso simpático y al eje Hipotálamo-hipofisario-adrenal, liberando catecolaminas y cortisol. La posterior inactivación de estas respuestas alostáticas hace que los sistemas vuelvan a los niveles basales. Sin embargo, si la inactivación es ineficiente, existe una sobreexposición del organismo a las hormonas de estrés, que si se prolonga, puede resultar en el aumento de la carga alostática (McEwen 1998).

Para cada sistema en el cuerpo, existen tanto acciones adaptativas protectoras (alostasis), y efectos de esas acciones prolongadas en el tiempo, que pueden ser dañinas (carga alostática).

Así por ejemplo, en el sistema cardiovascular, el rol de las catecolaminas en situaciones estresantes, al ajustar el ritmo cardíaco y la presión sanguínea, incluso también al dormir, al caminar o al hacer ejercicio físico, es un reflejo de la alostasis en el cuerpo. (McEwen y Seeman 1999). Pero, la carga alostática podría presentarse con repetidas o prolongadas alteraciones a causa del estrés, las cuales pueden traer como consecuencia el aumento en la presión sanguínea, que además podría acelerar el proceso de aterosclerosis y el padecimiento de diabetes tipo II (McEwen y Seeman 1999).

Igualmente los esteroides adrenales son sustancias que promueven la alostasis favoreciendo la disponibilidad de las reservas energéticas, cuando éstas son necesarias para reaccionar ante un evento específico. Pero la sobreactividad de éstas hormonas implica

la excitación constante del eje HHA o la elevación del cortisol en periodos nocturnos. Éstos signos de carga alostática aceleran también el padecimiento de diabetes tipo II, obesidad e hipertensión entre otros. (McEwen y Seeman 1999).

En el cerebro, las acciones de las hormonas adrenales, que están relacionadas con la alostasis, incluyen el aumento en la capacidad de memoria a corto plazo. Sin embargo, la sobreactividad del eje HHA, promueve una forma de carga alostática, que se evidencia como una disfunción cognitiva, producto de la reducción de la excitabilidad neuronal, de la atrofia neuronal, y en casos extremos, de la muerte de neuronas, particularmente en el hipocampo (McEwen y Seeman 1999).

El cálculo matemático de la carga alostática, se realiza con una sumatoria de parámetros biológicos que reflejan alteración en el funcionamiento del eje HHA, sistema nervioso simpático, sistema cardiovascular y algunos procesos metabólicos (Seeman *et al.* 2001).

El criterio de contribución al valor de la carga alostática de cada uno de los parámetros biológicos, se basa en límites normales definidos clínicamente y empíricamente; así, una persona que exceda el límite establecido para cada marcador, aumenta su AL y por tanto el riesgo de padecimiento de enfermedades del sistema nervioso, cardiovascular, respiratorio, entre otros (Seeman *et al.* 2001, Seeman *et al.* 2004). La alostasis y la carga alostática también son afectadas por el consumo de tabaco y alcohol, la dieta y el ejercicio (McEwen 1998).

La cuantificación de la carga alostática, incluye medidas metabólicas y cardiovasculares. Se han obtenido valores de la carga alostática mediante la suma de parámetros como presión arterial sistólica, cortisol urinario nocturno, excreción de catecolaminas, la proporción entre las medidas de la cintura y la cadera, el valor de la hemoglobina glicosilada, porcentaje de Lipoproteínas de baja densidad (LDL: *del inglés, Low Density Lipoproteins*) concentración sérica de dehidroepiandrosterona-sulfato y concentración sérica de Lipoproteínas de alta densidad (HDL: *High Density Lipoproteins*), entre otras (McEwen 1998).

La consideración de la carga alostática cobra cada vez mayor importancia en el diagnóstico y tratamiento de numerosas enfermedades. Asimismo, la carga alostática es importante para aclarar la relación entre la enfermedad y los factores sociales/ambientales como la inestabilidad social, la pérdida del empleo, inseguridad y otras condiciones que se consideran estresantes (McEwen 1998).

Una vez que se obtiene el valor de la AL, el análisis estadístico permite ubicar a las personas que pertenecen al mayor cuartil, como aquellas que se han expuesto a niveles más extremos de actividad del metabolismo, si se evalúan en forma relativa al resto de la

población. De esta forma, la AL se convierte en una manera cuantitativa de clasificar a quienes tienen el más alto riesgo de padecer alguna patología (Seeman *et al.* 2001, Seeman *et al.* 2004).

En resumen, se tiene que los eventos que se han relacionado con altos valores en la carga alostática son: la incidencia de enfermedades cardiovasculares, la disminución de la funcionalidad física y cognitiva, e incluso la mortalidad (Seeman *et al.* 2001, Seeman *et al.* 2004).

2.3 Respuesta neurofisiológica al estrés

El término “estrés” lo introduce el fisiólogo Walter Cannon en 1920 para referirse a la reacción fisiológica provocada por la percepción de una situación aversiva o amenazante (Carlson 1993, Gómez y Escobar 2002). Si en el enfrentamiento a esa situación se produce un desbalance entre los mecanismos fisiológicos que se utilizan para afrontarla, es cuando se habla del fenómeno de estrés (Carlson 1993, Gómez 2000).

El estrés suele manifestarse a través de una serie de reacciones que van desde la fatiga prolongada y el agotamiento, hasta dolores de cabeza, gastritis, úlceras, ocasionando también trastornos psicológicos (Glaxo SmithKline 2004).

El estrés normal, también llamado estrés agudo, forma parte de la vida cotidiana y no se puede considerar, en principio, como una enfermedad, sino como la respuesta tanto física como mental, a las adaptaciones y ajustes del ser humano a los diversos acontecimientos vitales (Glaxo SmithKline 2004).

La respuesta fisiológica ante los distintos estresores, puede darse como una activación autonómica, del sistema neuroendocrino o ambas.

Desde el punto de vista neurofisiológico se han descrito tres sistemas involucrados en la respuesta al estrés:

Sistema nervioso central (procesador de la información): quien se encarga de reconocer y procesar la información que puede ser estresante o no (Sadek y Nemeroff 2000).

Sistema autónomo: genera la primera respuesta al estrés. Esta respuesta se caracteriza por la liberación de catecolaminas: Norepinefrina y Epinefrina principalmente (Sadek y Nemeroff 2000).

Sistema neuroendocrino: genera una respuesta más lenta en el tiempo y básicamente se encarga de liberar los glucocorticoides, que contribuyen en la activación

general del sistema nervioso y en la preparación al organismo para reaccionar (Sadek y Nemeroff 2000).

2.3.1 Activación autonómica

Inicia con la excitación del hipotálamo como consecuencia de señales estresantes que vienen del medio. La información que llega a ésta región del cerebro, y que fue evaluada como peligrosa en procesos cognitivos previos, provoca la rápida liberación de catecolaminas: Norepinefrina y Epinefrina (Sadek y Nemeroff 2000).

La Norepinefrina y Epinefrina son las encargadas de poner el cuerpo en estado de alerta, preparándolo para luchar o huir. Ambas catecolaminas intervienen en gran parte de los procesos propios del sistema autónomo, tal y como se puede observar en la figura uno. Entre estos procesos se pueden mencionar:

- Dilatación de las pupilas.
- Dilatación bronquial.
- Movilización de los ácidos grasos.
- Incremento del ritmo cardíaco.
- Aumento de la glicemia.
- Vasodilatación muscular y vasoconstricción cutánea.
- Reducción de los niveles de estrógenos y testosterona, que son hormonas que estimulan el desarrollo de las características sexuales secundarias.
- Inhibición de la secreción de prolactina, que influye sobre la glándula mamaria.
- Incremento de la producción de tiroxina, que favorece el metabolismo energético y la síntesis de proteínas.

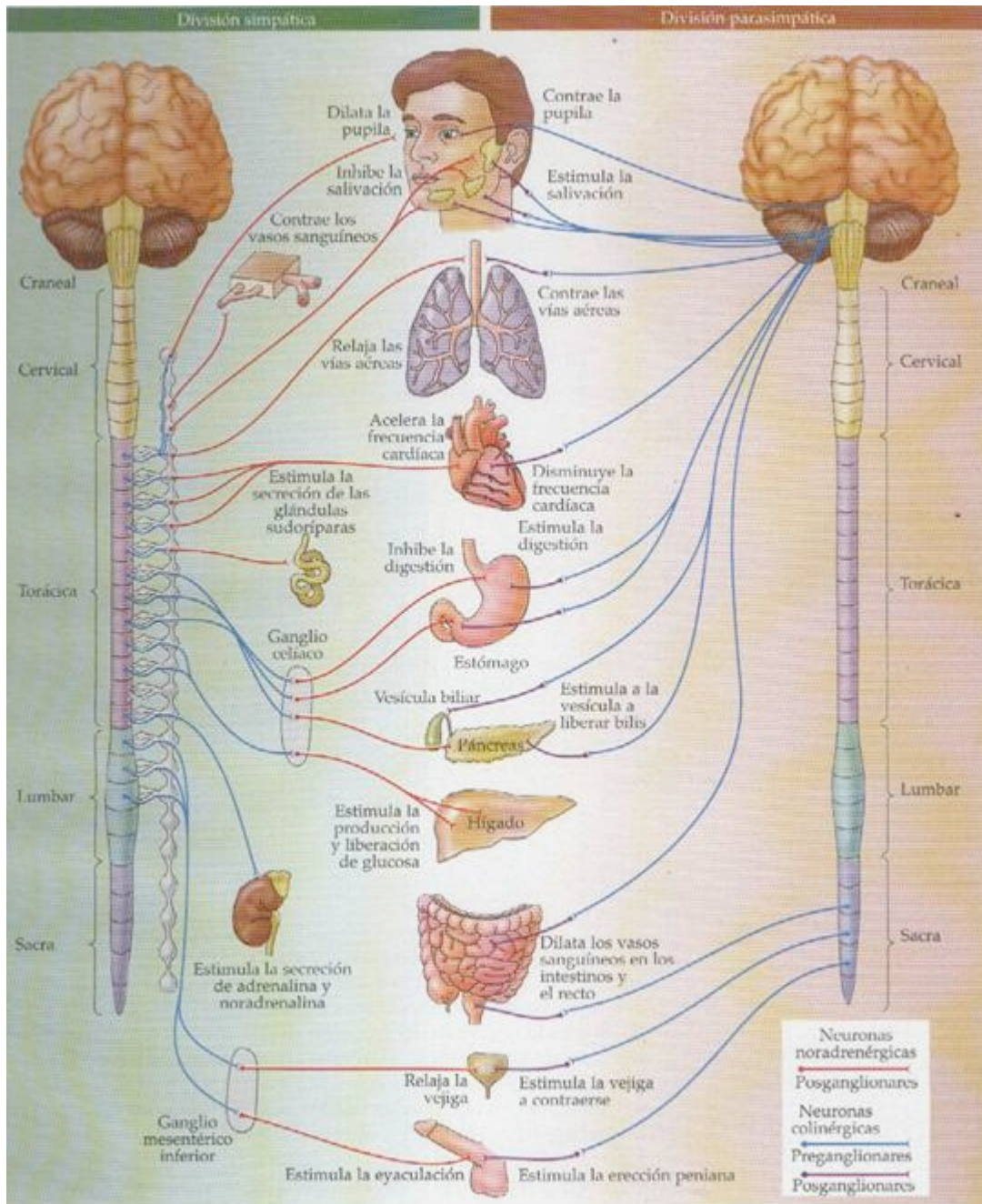


Figura 1. Esquema de las conexiones y respuestas autonómicas. Tomado de Purves *et al.* (2001)

2.3.2 Activación neuroendocrina

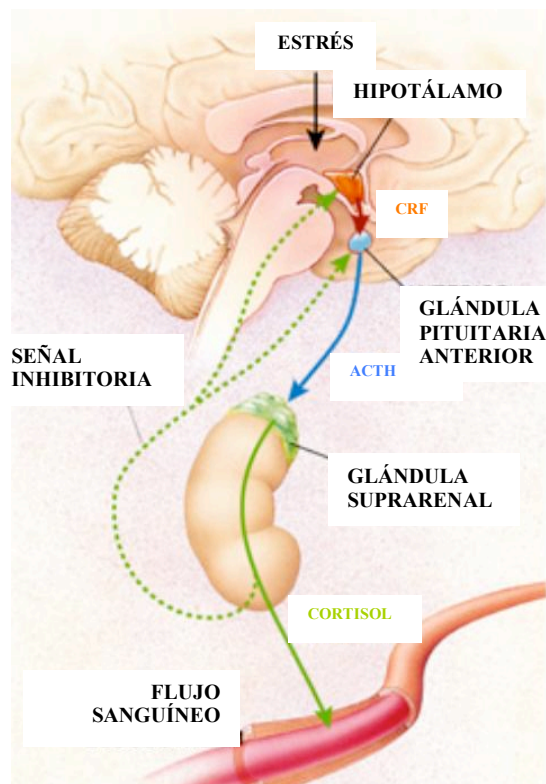


Figura 2. Esquema de la respuesta neuroendocrina al estrés. Modificado de Sadek y Nemeroff (2000)

La respuesta neuroendocrina es relativamente lenta puesto que se pone en marcha al cabo de segundos o minutos y su efecto se mantiene desde quince minutos y hasta por una hora. Se le denomina “neuroendocrina” porque su activación depende del sistema nervioso central y en ella participan además glándulas endocrinas (Sadek y Nemeroff 2000).

La activación neuroendocrina se inicia cuando las neuronas en el núcleo paraventricular del hipotálamo secretan un péptido llamado Factor Liberador de Corticotropina (CRF). La CRF y otras hormonas relacionadas entran en el sistema circulatorio porta-hipotálmico hipofisiario, para lograr que se libere de la hipófisis anterior corticotropina, también conocida como adenocorticotropa o ACTH (Carlson 1993). La corticotropina estimula a su vez a la corteza suprarrenal para que libere glucocorticoides como

el cortisol, la hidrocortisona y la corticosterona; y mineralocorticoides como la aldosterona (figura dos).

La liberación de glucocorticoides en situaciones de estrés provoca un aumento de glucosa en la sangre, ayuda a que las grasas se conviertan en energía, aumenta el flujo sanguíneo y estimula las respuestas conductuales, al tiempo que inhibe actividades vegetativas innecesarias en esos momentos (Carlson 1993).

Los efectos de los glucocorticoides como respuesta al estrés son importantes y necesarios, sin embargo, su activación a largo plazo puede generar efectos dañinos en la salud tales como aumento en la presión sanguínea, aterosclerosis, daño en el tejido muscular, infertilidad, inhibición del crecimiento y de las respuestas inflamatorias e inmunológicas (Carlson 1993). También se han descrito daños en estructuras cerebrales como el hipocampo (Matey 1999, McEwen 1999, Glaxo SmithKline 2004)

Los niveles de glucocorticoides se regulan mediante una retroalimentación negativa sobre la hipófisis anterior y el hipotálamo, a través de los receptores de estas sustancias que

están presentes en esas regiones cerebrales. Esto permite mantener los niveles de cortisol dentro de los rangos adecuados para cada situación (Sadek y Nemeroff 2000).

Tanto el estrés agudo como el estrés crónico pueden tener consecuencias a largo plazo. Los factores que determinan ampliamente las respuestas individuales a situaciones potencialmente estresantes son, por una parte, la forma en que la persona percibe una situación y por otra, su estado general de salud física, determinado este último no sólo por factores genéticos, sino también por su conducta y estilo de vida (McEwen 1998).

La capacidad para adaptarse al estrés reiterado está determinada además por el aprendizaje y el desarrollo de estrategias de afrontamiento eficaces, que se suman a la forma en que una persona percibe la situación. Por ejemplo, la mayoría de las personas reacciona inicialmente al hablar en público mediante la activación del eje HHA. Sin embargo, después de haber hablado varias veces, la mayoría se habitúa y su secreción de corticoesteroides deja de aumentar, o el aumento es menor ante este estímulo (McEwen 1998).

2.4 Comunicación intercelular en el organismo

Los seres humanos, al igual que otros organismos superiores, son individuos muy complejos en cuanto a su estructura celular y anatómica. Esta estructura demanda una perfecta coordinación de las funciones metabólicas en espacio y tiempo, para lo cual se requieren mecanismos de interacción y comunicación intercelular muy avanzados.

Existen varias formas por las que las células y tejidos pueden comunicarse unos con otros, que implican en la mayor parte de los casos, el intercambio de sustancias para la transmisión de una señal (Martini 1998). Las células del sistema nervioso están anatómica y fisiológicamente especializadas para la transmisión intercelular de señales químicas y eléctricas, así como para el transporte de metabolitos de una célula a la otra y de solutos del interior de la célula al espacio extracelular (Zigmond *et al.* 1999).

El sistema nervioso utiliza muchos y muy diversos procesos para la comunicación intercelular. Estos procesos incluyen la transmisión electro-sináptica y señalización autocrina (activa señales para la misma célula que las secreta) y paracrina (activa señales que son captadas por las células vecinas), en las cuales, las moléculas son producidas por células tanto del sistema nervioso como de otros sistemas que interactúan con este (Zigmond *et al.* 1999).

En la comunicación intercelular, los estímulos en las células nerviosas pueden liberar sustancias químicas como neurotransmisores u hormonas que se unirán a receptores específicos de las células blanco, y pueden eventualmente generar cambios en estas células, como por ejemplo modificar la expresión de algunos genes (Greger y Windhorst 1996).

2.5 Transmisión de señales

Las moléculas extracelulares que llevan señales son llamadas primeros mensajeros e incluyen a los neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento. La función primordial de las moléculas extracelulares es la comunicación intercelular (Roskoski 1997).

2.5.1 Señalamiento neuronal

En el encéfalo humano, las neuronas se comunican principalmente liberando mensajeros químicos denominados neurotransmisores, aunque en algunos casos también se comunican mediante sinapsis eléctricas (Roskoski 1997).

Un *neurotransmisor* es una sustancia secretada por las neuronas y que se difunde a una corta distancia hasta llegar a las células blanco, donde produce una respuesta fisiológica (Roskoski 1997).

El proceso mediante el cual se lleva a cabo la sinapsis utilizando neurotransmisores se muestra en la figura tres, e implica tres procesos básicos:

- 1) Síntesis y empaquetamiento en vesículas
- 2) Liberación y unión a los receptores
- 3) Eliminación o degradación. (Kandel *et al.* 1991, Greger y Windhorst 1996, Purves *et al.* 2001)

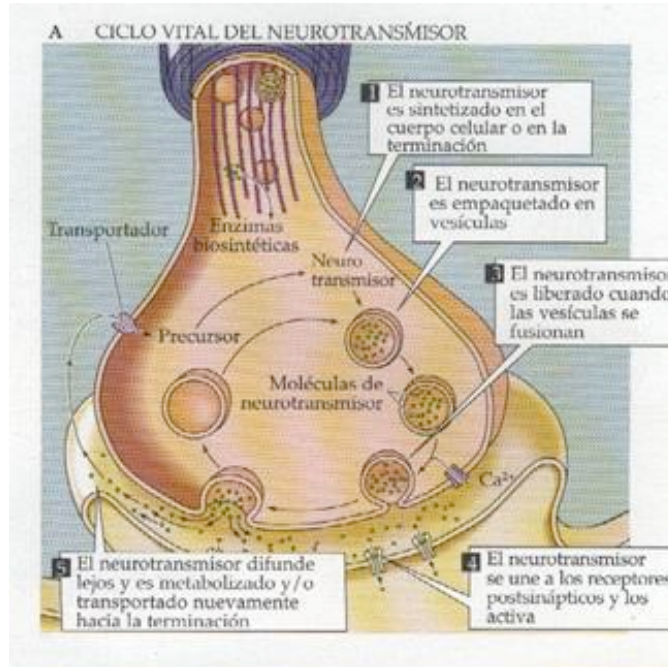


Figura 3. Esquema del proceso de síntesis de neurotransmisores, empaquetamiento, liberación y unión a los receptores. Tomado de Purves *et al.* (2001)

Cuando el sistema de comunicación a través de neurotransmisores no funciona adecuadamente, se producen una amplia gama de trastornos neurológicos y psiquiátricos; es por esa razón que gran cantidad de las terapias o tratamientos de esas enfermedades se basan en la regulación de estas sustancias y sus procesos de síntesis, de empaquetamiento, de liberación, de unión a receptores y de degradación (Purves *et al.* 2001).

2.5.1.1 Síntesis de los neurotransmisores

Una transmisión sináptica eficaz requiere un control cuidadoso de la concentración de los neurotransmisores en el interior de la hendidura sináptica. Por eso, las neuronas han desarrollado una capacidad sofisticada para regular la síntesis, el empaquetamiento, la liberación y la degradación de los neurotransmisores (Purves *et al.* 2001).

De acuerdo con Purves *et al.* (2001) la síntesis de los neurotransmisores de moléculas pequeñas (entre los que se encuentran las catecolaminas), se desarrolla localmente en las terminales presinápticas. Las enzimas necesarias para la síntesis de los neurotransmisores son transportadas hasta el citoplasma de la terminación nerviosa por un mecanismo conocido como transporte axónico lento. Las moléculas precursoras utilizadas por estas

enzimas suelen ser captadas en la terminación nerviosa por proteínas de transporte que se encuentran en la membrana plasmática de la terminación (Purves *et al.* 2001).

2.5.1.2 Liberación y eliminación de los neurotransmisores

Las vesículas que contienen los neurotransmisores se asocian con la membrana presináptica y se fusionan con ella en respuesta a la entrada del ión Ca^{2+} .

Cuando el transmisor ha sido secretado en la hendidura sináptica, se une a receptores específicos en la célula postsináptica, generando así una señal eléctrica. Una vez que esto sucede, el transmisor debe ser eliminado rápidamente para permitir que la célula postsináptica participe en otro ciclo de liberación, fijación del neurotransmisor y generación de señales. Los mecanismos por los cuales se eliminan los neurotransmisores varían, pero siempre implican la difusión, la recaptación en las terminaciones nerviosas o las células gliales circundantes, la degradación por enzimas específicas o, en algunos casos, una combinación de estas (Purves *et al.* 2001).

2.5.1.3 Receptores de los neurotransmisores

Cada uno de los neurotransmisores se une a receptores específicos que son proteínas de la membrana plasmática, ésta unión desencadena una serie de cambios en la célula, como por ejemplo la apertura o cierre de canales iónicos en la membrana durante la sinapsis (Purves *et al.* 2001, Mckee y Mckee 2003).

Existen dos clases principales de receptores de neurotransmisores: a) Los denominados canales iónicos regulados por ligando, b) Los receptores metabotrópicos. Un transmisor dado, puede activar tanto a los receptores metabotrópicos como a los canales iónicos regulados por ligando, para producir tanto potenciales postsinápticos “rápidos” (con receptores ionotrópicos), como “lentos” (receptores metabotrópicos) en una única sinapsis (Purves *et al.* 2001, Mckee y Mckee 2003).

2.5.2 Señalamiento humoral

El modo no sináptico de transmisión extracelular más utilizado por el organismo, es el señalamiento humoral (hormonal).

Una *hormona* es una sustancia secretada por las células en cantidades traza (microgramos o nanogramos) y es transportada por el torrente sanguíneo a las células blanco, donde regula el metabolismo mediante la modificación de ciertas funciones fisiológicas (Roskoski 1997).

Las hormonas periféricas pueden entrar al sistema nervioso, e incluso producirse dentro de este, para conducir, inhibir o modular la actividad neuronal y las respuestas en el organismo (Zigmond *et al.* 1999).

Las catecolaminas, por su modo de funcionar, distribución en el cuerpo, y lugar de liberación, son consideradas moléculas de señalamiento con características tanto de neurotransmisores como de hormonas (Mathews *et al.* 2002).

2.6 Catecolaminas

2.6.1 Definición

El término catecolamina se refiere generalmente a compuestos orgánicos que contienen un núcleo catecol (un anillo de benceno con dos sustituciones adyacentes de grupos hidroxilo) y un grupo amino (Zigmond *et al.* 1999) (figuras cinco y seis). Son moléculas relativamente pequeñas y estructuralmente semejantes a los aminoácidos, debido a que estos últimos son sus precursores (Martini 1998).

Las principales catecolaminas conocidas son la dopamina, norepinefrina (también llamada noradrenalina) y epinefrina (o adrenalina).

Son sustancias solubles en agua, que cuando son secretadas por el cerebro u otro tejido neural, funcionan como neurotransmisores, sin embargo, específicamente la epinefrina y la norepinefrina, también se producen y son secretadas como hormonas por las glándulas adrenales (Nelson y Cox 2000).

Actúan sobre prácticamente todos los tejidos del cuerpo y están relacionadas con la regulación de una amplia variedad de procesos. Las catecolaminas son metabolizadas por los tejidos destinatarios o por el hígado y el resultado de ese proceso metabólico genera otras sustancias o metabolitos que aparecen en la orina; así, la dopamina se convierte en ácido homovanílico (AHV), la norepinefrina se convierte en normetanefrina y ácido

vanilmandélico (AVM); y la epinefrina se convierte en metanefrina y AVM (Adam Quality 2001). En la orina también se pueden encontrar cantidades considerables de estas catecolaminas que no han sido metabolizadas y que por tanto son medibles por diferentes métodos de análisis.

2.6.2 Biosíntesis

Los aminoácidos fenilalanina y tirosina, que son los precursores de las catecolaminas, están presentes en el plasma y en el cerebro en altas concentraciones. En los mamíferos, la tirosina también se deriva de la fenilalanina que se consume en la dieta, gracias a la enzima fenilalanina hidroxilasa que se encuentra principalmente en el hígado (Zigmond *et al.* 1999). Las catecolaminas se forman en el cerebro, las células cromafines adrenales y los nervios del sistema simpático. En general los procesos que regulan de la síntesis son los mismos en los diferentes tejidos (Zigmond *et al.* 1999).

El ciclo de las catecolaminas, tal y como se observa en la figura cuatro, parte del aminoácido tirosina, el cual, por acción de la tirosina hidroxilasa (TH), se convierte en 3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa). La L-dopa es metabolizada casi inmediatamente para producir dopamina, gracias a la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) (también llamada dopa descarboxilasa) (Biopsicología 2004). En las neuronas que liberan dopamina, este es el paso final en la síntesis de los neurotransmisores, sin embargo, en las neuronas que utilizan norepinefrina y epinefrina como transmisores, la dopamina es oxidada por la dopamina β -hidroxilasa (DBH) o β -hidroxi-dopamina y se transforma en norepinefrina (NE), que se biosintetiza en las terminaciones sinápticas. Finalmente, en las neuronas en las que la epinefrina se utiliza como transmisor, una tercera enzima, la feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT), convierte la Norepinefrina en Epinefrina (E) por una metilación en el grupo amino terminal (Zigmond *et al.* 1999, Biopsicología 2004).

El transmisor de una neurona es la última catecolamina que se forma, según las enzimas que en ella se encuentran, de tal forma que una neurona adrenérgica (aquella que utiliza epinefrina como transmisor), contiene cuatro enzimas (TH, AADC, DBH, PNMT) que secuencialmente metabolizan la tirosina hasta obtener epinefrina; las neuronas noradrenérgicas expresan sólo las enzimas TH, AADC y DBH y por lo tanto la norepinefrina no puede ser metabolizada a epinefrina. Por último en las neuronas dopaminérgicas sólo se encuentran TH y AADC (Zigmond *et al.* 1999).

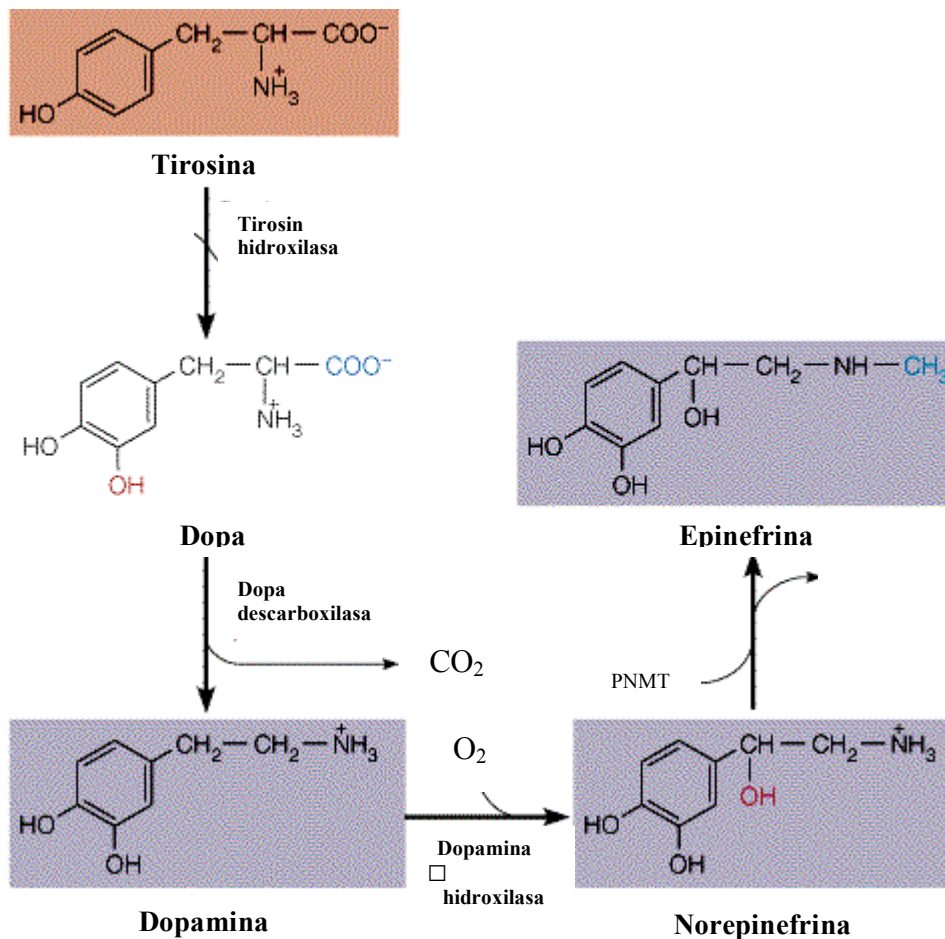


Figura 4. Biosíntesis de catecolaminas. Tomado de Mathews *et al.* (2002)

2.6.3 Almacenamiento

Los neurotransmisores son almacenados en vesículas sinápticas donde están protegidos de la degradación enzimática, y donde se encuentran disponibles y listos para la pronta liberación (Zigmond *et al.* 1999).

Generalmente encontramos catecolaminas en una baja concentración de forma libre en el citosol, donde pueden ser metabolizadas por diversas enzimas incluyendo las monoaminooxidasas (MAO). La conversión de tirosina a L-dopa, y de L-dopa a dopamina, tiene lugar en el citosol; de ahí, posteriormente la dopamina es introducida en las vesículas de almacenamiento. En las neuronas que contienen norepinefrina, la β -hidroxilación final se produce en el interior de estas vesículas. En la glándula adrenal, la norepinefrina es N-

metilada por la PNMT en el citoplasma y finalmente la epinefrina es transportada de vuelta a los gránulos para su almacenamiento (Siegel *et al.* 1994).

El mecanismo que concentra a las catecolaminas en el interior de las vesículas es un proceso dependiente del adenosín-trifosfato (ATP) ligado a una bomba de protones. El proceso de recaptación vesicular es relativamente específico, pues con él también se transportan varias aminas biogénicas, incluyendo a la triptamina, la tiramina y a las anfetaminas; estas aminas pueden competir con las catecolaminas endógenas por ocupar un lugar en las vesículas de almacenamiento (Siegel *et al.* 1994).

2.6.4 Liberación de catecolaminas

La liberación de neurotransmisores ocurre por medio de una ruta regulada y controlada por señales extracelulares (Zigmond *et al.* 1999).

En general las catecolaminas son liberadas por el mismo proceso dependiente de Ca^{2+} (exocitosis). Aunque en el caso de la dopamina se ha reportado también un proceso de liberación que utiliza autoreceptores (Zigmond *et al.* 1999).

Las catecolaminas epinefrina y norepinefrina se han asociado a condiciones de estrés, y además algunos estudios relacionan a estas hormonas adrenomedulares simpáticas, como moduladores endógenos de la memoria (Zigmond *et al.* 1999).

La epinefrina, que es liberada desde la médula adrenal, no entra en el cerebro, sino que su efecto modulador de la memoria resulta como consecuencia de la activación del sistema nervioso periférico. La epinefrina aumenta los niveles de norepinefrina en las estructuras límbicas, incluyendo la amígdala, y potencia los niveles de otras sustancias en el *locus coeruleus* (conjunto de células noradrenérgicas que se proyectan desde las regiones del cerebro que están relacionadas con el almacenamiento de la memoria, como la amígdala y el hipocampo) (Zigmond *et al.* 1999).

2.6.5 Norepinefrina

Es un neurotransmisor que se encuentra en el cerebro y en la mayoría de las fibras simpáticas post-gangliónicas. Los cuerpos celulares de las neuronas noradrenérgicas están localizadas principalmente en el *locus coeruleus*, en el piso del cuarto ventrículo (Greger y Windhorst 1996), a pesar de que estas neuronas son relativamente pocas, se proyectan en forma difusa a través de la corteza, hipocampo, cerebelo y cordón espinal (Kandel *et al.* 1991, Siegel *et al.* 1994)

Otros cuerpos celulares proyectan fibras que conectan con el tallo cerebral y el hipotálamo (Siegel *et al.* 1994).

La norepinefrina se almacena en vesículas de las terminales del axón desde donde se libera para la transmisión sináptica del impulso nervioso. Afecta rápidamente las funciones fisiológicas y el metabolismo de la mayoría de los órganos al estimular, en la mayoría de los casos, la síntesis de Adenosín-monofosfato cíclico (AMPC) (Biopsicología 2004).

En el sistema nervioso periférico, se forma en las neuronas postgangliónicas del sistema nervioso simpático específicamente (Kandel *et al.* 1991, Roskoski 1997).

En su función humoral, se forma en la médula suprarrenal. La norepinefrina se almacena en los gránulos de secreción hasta el momento en que las células son estimuladas para liberar la hormona a la sangre. La mayor parte de la norepinefrina es metilada por una feniletanolamina N-metil-transferasa relativamente inespecífica para dar epinefrina, que también se almacena en los gránulos cromafínicos. (Biopsicología 2004)

La norepinefrina (figura cinco) es uno de los principales neurotransmisores estimuladores que se conocen.

Las neuronas noradrenérgicas son especialmente importantes para modular el sueño y la vigilia (Purves *et al.* 2001).

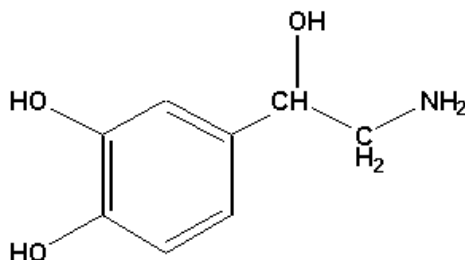


Figura 5. Estructura de la Norepinefrina. Tomado de Mathews *et al* (2002).

2.6.6 Epinefrina

La epinefrina o adrenalina (figura seis) es un neurotransmisor en el cerebro, pero también una de las hormonas principales del cuerpo (Adam Quality 2001). Por un lado tiene su origen en las neuronas adrenérgicas y por el otro, es secretada por la médula suprarrenal en respuesta a niveles bajos de glucosa sanguínea, ejercicio y varias formas de estrés agudo (en el último caso, el cerebro estimula la liberación de la hormona).

La epinefrina causa la degradación del glucógeno a glucosa en el hígado y en los músculos esqueléticos, y la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo. También provoca la vasodilatación de pequeñas arterias dentro del tejido muscular, aumenta el ritmo y fuerza del latido cardiaco (Adam Quality 2001) y dilata las vías respiratorias para que ingrese mayor cantidad de oxígeno a la sangre (necesario para la síntesis de Adenosín-trifosfato o ATP en las mitocondrias) (Fornaguera y Gómez 2004).

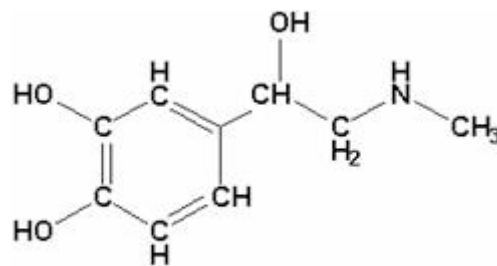


Figura 6. Estructura de la Epinefrina. Tomado de Mathews *et al* (2002)

La epinefrina está presente en niveles mucho menores en el encéfalo que cualquiera de las otras catecolaminas, aunque se han logrado identificar dos grupos importantes de neuronas adrenérgicas en el bulbo rostral y la médula oblongada, de donde se proyectan algunas terminales nerviosas hacia el tallo cerebral y el hipotálamo (Siegel *et al.* 1994, Purves *et al.* 2001).

Inicialmente se desconocía la presencia de esta catecolamina en el sistema nervioso central, pero fue gracias a técnicas de inmunohistoquímica que se demostró la existencia de neuronas adrenérgicas, en las que se producía tinción como respuesta a la utilización de anticuerpos contra la enzima PNMT (enzima que permite la conversión de norepinefrina a epinefrina, figura cuatro) (Nieuwenhuys 1985).

2.6.7 Los exámenes de catecolaminas en orina

Las catecolaminas pueden ser medidas tanto en la sangre como en la orina. Uno de los métodos más frecuentes empleados en este análisis es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*) por la sensibilidad y especificidad que se logra.

Ciertos alimentos como el café, té, plátanos, chocolate, cacao, frutas cítricas y vainilla pueden aumentar las catecolaminas urinarias, por lo tanto, es preciso evitarlos por varios días antes del examen (Adam Quality 2001).

Otras condiciones como el estrés agudo y el ejercicio vigoroso pueden también afectar y por lo tanto deben considerarse cuando se analiza el resultado del examen. (Adam Quality 2001).

El examen es empleado principalmente como exploración selectiva, diagnóstico y seguimiento del tratamiento de feocromocitoma o neuroblastoma, enfermedades en las que está aumentada la concentración de las catecolaminas y sus metabolitos (Adam Quality 2001).

Algunos medicamentos también pueden alterar los resultados del examen, por lo que se debe consultar con el médico sobre la necesidad de suspenderlos o en su defecto considerar muy bien las variaciones causadas por los mismos al momento de interpretar los resultados obtenidos (Adam Quality 2001).

Ésta consideración es particularmente importante en el caso de los adultos mayores, quienes generalmente se encuentran altamente medicados para tratar problemas como hipertensión, depresión o hiperglicemia entre otros.

Entre las drogas que pueden disminuir los niveles de catecolaminas se encuentran clonidina, disulfiram, guanetidina, imipramina, inhibidores de monoaminooxidasa, fenotiacinas, salicilatos y reserpina (Adam Quality 2001).

2.6.7.1 Valores normales en el examen de excreción urinaria

La colecta de la orina se realiza normalmente durante 24 horas, período en el que se obtienen muestras representativas tanto de los estados de mayor actividad (durante el día) como los de menor actividad (por la noche). Otros estudios más específicos, como por ejemplo la determinación de la carga alostática, utilizan la medición de catecolaminas en muestras de orina colectada durante 12 horas durante la noche, por representar más adecuadamente los niveles basales del metabolismo de estas sustancias en el cuerpo.

Se ha encontrado una amplia variabilidad en los estudios de concentraciones normales de catecolaminas, pero sobre todo muy diversas unidades utilizadas en los reportes. Así por ejemplo, en mediciones de catecolaminas en personas menores de 60 años, se ha encontrado que los valores normales de epinefrina están por debajo de 20 $\mu\text{g}/\text{día}$, en el caso de norepinefrina son menores de 100 $\mu\text{g}/\text{día}$ y para la dopamina se esperan valores por debajo de los 400 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Bionalytical Systems 2001, IBL online catalogue 2004).

Los estudios con adultos mayores, presentan datos que no permiten una comparación con los valores normales antes reportados, pues, además de que la unidad en la que se expresan es diferente, los reportes se basan no en valores normales, sino en criterios de contribución a la carga alostática, así, cuando el dato resulta mayor o igual a cinco microgramos de epinefrina por gramo de creatinina, o mayor o igual a 48 microgramos de norepinefrina por gramo de creatinina, se produce un aporte para el aumento de la carga alostática del adulto mayor que se está evaluando (Seeman *et al.* 2001, Seeman *et al.* 2004). No se encontraron estudios semejantes en adultos mayores en donde se evalúen los valores de Dopamina.

2.7 Principio de Cromatografía de columna

Como ya se mencionó en la introducción de este trabajo, el método seleccionado para la medición de catecolaminas es el de cromatografía líquida de alta resolución. Los métodos cromatográficos en general implican el paso de una solución a través de un medio (columna) que presenta una adsorción selectiva para los distintos componentes del soluto (Mathews y van Holde 1999).

La columna está constituida por un material que puede adsorber moléculas de modo selectivo debido a alguna diferencia en su estructura química; esta columna se humedece con una solución tampón adecuada (fase móvil). A continuación se coloca la mezcla de las moléculas que se van a separar en la parte superior de la columna y se hace pasar lentamente a lo largo de esta, junto con una solución tampón. Se toman fracciones, mientras continúa este proceso de elusión (paso a través de la columna). Algunas clases de moléculas sólo se adsorben débilmente o no se adsorben en lo absoluto, con lo que son las primeras en eluir. Las que se adsorben con más intensidad, son por tanto, las últimas en fluir. En ocasiones debe modificarse la composición de la solución tampón durante la elusión, para eliminar las moléculas más fuertemente ligadas (Mathews y van Holde 1999).

En los métodos cromatográficos, se le denomina fase móvil a la solución tampón en la que se diluye la muestra por analizar, mientras que a la matriz sólida se le llama fase

estacionaria. Es así como el movimiento relativo de cada molécula es consecuencia de su capacidad para permanecer asociada con la fase estacionaria, mientras que continúa fluyendo la fase móvil (Mckee y Mckee 2003).

2.7.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución, es la técnica de separación más ampliamente utilizada por su aplicabilidad en la industria y en muchos campos de la ciencia. Su versatilidad se ve reflejada en características de gran utilidad como lo son su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas e idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles (Skoog y Learly 1994).

Es una de las modificaciones más recientes de las técnicas de cromatografía de columna, en la que las muestras son inyectadas, y arrastradas a altas presiones en un aparato automatizado (2000-4000 psi), para hacer que las soluciones pasen rápidamente a través de la fase estacionaria. Con este método, las separaciones que anteriormente tardaban horas, en la actualidad pueden realizarse en minutos y con una resolución más elevada (Mathews y van Holde 1999).

2.7.1.1 Instrumentación para cromatografía de líquidos

A continuación se describen de manera general los componentes fundamentales de un cromatógrafo de alta resolución:

Recipientes para la fase móvil y sistemas para el tratamiento de los disolventes

Los sistemas para HPLC se equipan con uno o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene aproximadamente 500ml de un disolvente. Los recipientes a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos (desgasificador) que permite eliminar principalmente oxígeno y nitrógeno que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección. Los sistemas también deben incluir un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión de los disolventes (Skoog y Learly 1994).

Una separación que utiliza un solo disolvente de composición constante se denomina elusión isocrática.

Sistemas de bombeo: Los requisitos para un sistema de bombeo en HPLC son rigurosos e incluyen: a) generación de presiones por encima de 6000 psi (lbs/pulg²)- razón por la que también se le llama cromatografía de alta presión-, b) un flujo libre de pulsaciones, c) un intervalo de caudales entre 0,1 a 10 ml/min, d) que esté formado por componentes

resistentes a la corrosión. En el mercado existen tres tipos de bombas: las recíprocas, las de desplazamiento, y las neumáticas, en su mayoría poseen dispositivos controlados por una computadora para medir y regular el caudal o flujo (Skoog y Learly 1994).

Sistemas de inyección de muestra: Para favorecer la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna se inyectan volúmenes muy pequeños en sistemas que emplean asas o “loops” que permiten introducir la muestra a presión con una precisión relativamente alta (Skoog y Learly 1994).

Columnas analíticas para cromatografía de líquidos: Se construyen normalmente con tubos de acero inoxidable de diámetro interno uniforme. La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 10 y 30 cm, un diámetro de cuatro a 10mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son tres, cinco y 10 μ m (Skoog y Learly 1994). La columna es el medio que retiene diferencialmente las sustancias por evaluar y que las separa de manera que pueda realizarse efectivamente una detección posterior.

Precolumnas: Se colocan delante de las columnas para aumentar la vida útil de éstas, eliminando la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. Además, la precolumna se emplea para saturar la fase estacionaria con la fase móvil y así minimizar las pérdidas de ésta en la columna analítica. La composición del relleno de precolumna debe ser semejante al de la columna analítica, sin embargo, el tamaño de partícula generalmente es mayor, para minimizar la caída de presión. (Skoog y Learly 1994).

Termostatos: Son hornos que controlan la temperatura de las columnas analíticas hasta en décimas de grado. En muchas aplicaciones no se necesita un control estricto de temperatura, sin embargo, si ésta se controla, se obtienen cromatogramas mejor definidos.

Tipos de relleno de la columna: En cromatografía líquida se han utilizado dos tipos básicos de relleno: el pelicular y el de partícula porosa. El primero consiste en esferas de vidrio o de polímero, no porosas, y con diámetros de 30 a 40 μ m. En la superficie de estas esferas se deposita una capa delgada y porosa de sílice, alúmina o de una resina de intercambio iónico; en algunos casos también se adiciona un recubrimiento con una fase estacionaria líquida que se mantiene fija por adsorción. Los de partículas porosas están formados por esferas con diámetros entre 3 y 10 μ m, hechas a partir de sílice, alúmina o resinas de intercambio iónico (Skoog y Learly 1994).

Detectores: Existen distintos tipos de detectores para cromatografía líquida según las necesidades o disponibilidad para el análisis de las sustancias en cada caso. Existen detectores que miden absorbancia, fluorescencia, índice de refracción, dispersión de luz, y por espectrometría de masas (Skoog y Learly 1994). También hay detectores

electroquímicos como el que se utilizó para la medición de catecolaminas en el Programa de Investigación en Neurociencias.

Detectores electroquímicos: Estos dispositivos se basan en cuatro métodos electroanalíticos que incluyen la amperometría, la voltamperometría, la coulombimetría y la conductimetría. Los procedimientos electroquímicos de detección ofrecen ventajas por su elevada sensibilidad, simplicidad, adecuación y extensa aplicabilidad. Los cromatógrafos con detección electroquímica funcionan con dos electrodos, uno de ellos es el de referencia y el otro es el de trabajo. El electrodo de trabajo es de platino, oro, carbono vitrificado o de pasta de carbono y es donde se llevan a cabo las oxidaciones o reducciones de las sustancias por evaluar. El electrodo de referencia se coloca más adelante en el canal de flujo, por detrás del bloque del electrodo de trabajo y con base en él se mide la diferencia de potencial que existe, así como la intensidad de la señal que emite cada sustancia (oxidada o reducida), señal que además se amplifica para lograr su detección por los aparatos de medición internos. El efluente de la columna pasa primero por el electrodo de trabajo, donde sufre un proceso de reducción (u oxidación); a continuación, el segundo electrodo actúa como cátodo (o ánodo) para detectar de ésta manera el producto de la oxidación (o reducción) que ha sufrido la sustancia en análisis (Skoog y Learly 1994).

2.8 Bases teóricas de la detección electroquímica

La detección electroquímica difiere de otros métodos de detección en que los analitos experimentan una reacción electroquímica mientras están siendo analizados. Mientras se lleva a cabo la elusión a través de la columna, el analito pasa a través de la celda electroquímica, donde experimenta también una oxidación o reducción en el electrodo de trabajo.

El controlador (potenciostato) mantiene el potencial del electrodo de trabajo en un valor en el que causa la electrólisis del analito (el valor está dado en relación con el electrodo de referencia). Simultáneamente mide la corriente de electrólisis resultante de la oxidación (o reducción) del analito (Waters 1991).

Si el potencial es mayor (más positivo para las oxidaciones o más negativo para las reducciones) que lo requerido para la electrólisis de los analitos, una carga medible pasa desde el electrodo hacia el analito o viceversa, y la corriente resultante es directamente proporcional a la concentración del soluto que está pasando a través del canal de flujo, esta corriente será subsecuentemente convertida a voltaje de modo que es posible obtener los cromatogramas (BAS 1983).

2.9 Principio de extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida es un método que se utiliza para el pretratamiento de las muestras antes de ser analizadas, y que por sus características permite su uso en distintas aplicaciones como análisis ambientales y farmacéuticos, análisis bioquímicos, de química orgánica, análisis de alimentos y HPLC entre otros (Macherey-Nagel 2000).

El proceso de extracción en fase sólida presenta algunas ventajas sobre los métodos de extracción líquido-líquido, como lo son:

- Bajo consumo de solventes.
- Disminuye el tiempo del proceso y tiene un alto potencial de automatización.
- La preparación de las muestras utilizando extracción en fase sólida puede ser más específica, pues pueden promoverse tantas y tan diferentes interacciones del analito con la fase sólida como sea necesario.
- Las condiciones de la extracción pueden ser optimizadas de manera que se ajusten al proceso y condiciones de la técnica de cromatografía con la que se cuente.
- El proceso de extracción en fase sólida ofrece amplia variedad de columnas absorbentes para interacciones polar hidrofóbico y/o iónicas, mientras que la extracción líquido-líquido está limitada por el equilibrio “de partición” de la fase líquida (Thermo Electron Corporation 2004-2005).

Los principales objetivos del proceso de extracción en fase sólida son:

- Remover de la matriz los compuestos de interferencia.
- Concentrar y aislar selectivamente el analito de interés.
- Cambiar la matriz del analito, de manera que pueda llevarse a cabo con éxito el análisis posterior (Thermo Electron Corporation 2004-2005).

El analito puede ser absorbido en el material de la columna de extracción o fluir directamente a través de ésta, mientras que las sustancias de interferencia son retenidas. (figura siete). Antes de adicionar la muestra se realiza generalmente un acondicionamiento de la columna con un líquido que humedece la columna pero que no se adhiere a ella por sus características químicas.

Los dos procesos generales de separación se muestran en la figura siete.

En el primer caso la muestra se hace pasar a través de la columna de extracción. Las moléculas del analito son absorbidas, mientras que los compuestos de interferencia son lavados con una solución que permite solubilizarlos. Finalmente el analito es removido de la

columna con un eluyente que permite arrastrarlo para su análisis (figura siete-A) (Macherey-Nagel 2000).

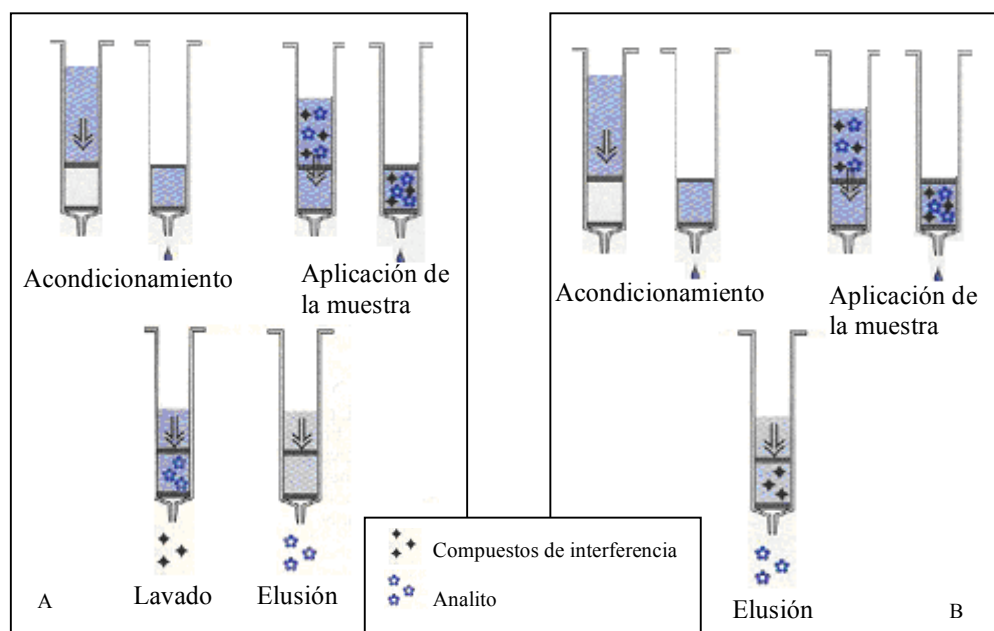


Figura 7. Mecanismos mediante los que se logra la elusión de los compuestos en el proceso de extracción en fase sólida. A. Las moléculas del analito son adsorbidas primero. B. El analito eluye antes que los compuestos de interferencia. Tomado de (Macherey-Nagel 2000).

En otros casos, los compuestos de interferencia quedan fuertemente atrapados en el absorbente, ofreciendo la posibilidad de una prepurificación de matrices dificultosas. Este procedimiento se muestra en la figura siete-B (Macherey-Nagel 2000).

2.9.1 Interacciones moleculares en la extracción en fase sólida

2.9.1.1 Interacciones no polares

Ocurre entre los residuos de hidrocarburos de los grupos funcionales en la columna de absorción, y el analito. Mientras más compuestos orgánicos tengan una estructura no polar, pueden ser mejor absorbidos con columnas no polares gracias a las fuerzas de van der Waals que se establecen entre ellos.

Casi todos los compuestos orgánicos tienen algún potencial de interacción no polar. Las excepciones son compuestos que poseen un amplio número de grupos polares o iónicos.

Las típicas columnas con carácter no polar son por ejemplo las sílicas C18ec, C18, C18 Hydra y C18 modificada. Estas columnas muestran una baja selectividad pues sus grupos funcionales, sustituyentes alquil, pueden interactuar con casi todos los analitos no polares y pueden ser usadas para el aislamiento de grupos de sustancias de diferente estructura. En este tipo de columna el acondicionamiento se lleva a cabo con solventes miscibles en agua (metanol, isopropanol, etc), seguido por el solvente en el cual el analito estará disuelto (Thermo Hypersil-Keystone 2002).

2.9.1.2 Interacciones polares

Incluyen interacciones de los puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo y π - π , las cuales pueden ocurrir entre las columnas y los grupos funcionales de muchas y muy diferentes sustancias y solventes. Algunas de estas interacciones se dan con grupos amino, hidroxilo y carbonilo, incluso con anillos aromáticos y dobles enlaces. Los típicos absorbentes polares incluyen sílica modificada con los siguientes grupos funcionales: CN, NH₂ y OH (diol), aunque también presentan sílica no modificada.

En general, los compuestos polares son fácilmente absorbidos por una columna polar en un ambiente no polar, y son eluidas con solventes polares.

Las columnas polares se acondicionan con solventes no polares (Termo Hypersil-Keystone 2002).

En el estudio que se realizó, se emplearon las técnicas de extracción en fase sólida y cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica para la medición de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) en orina de adultos mayores.

El protocolo para su cuantificación se estandarizó y validó después de realizar las pruebas que se describen en el siguiente apartado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Las evaluaciones analíticas correspondientes al Trabajo Final de Graduación se llevaron a cabo en los laboratorios del Programa de Investigación en Neurociencias, en la Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca.

La definición del protocolo para la medición de catecolaminas en orina comprende la estandarización de tres procesos: la colecta de la muestra, el análisis, y el manejo y manipulación de la misma.

A continuación se describe la metodología mediante la que se logró la validación de los protocolos que se emplearán en lo sucesivo en el Programa de Investigación en Neurociencias, para el análisis de catecolaminas de las muestras del Proyecto CRELES.

3.1 Colecta

Para determinar el procedimiento a seguir en la colecta de las muestras, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva, utilizando como base otros estudios que han evaluado carga alostática en adultos mayores (Ming-Cheng *et al.* 2000, Seeman *et al.* 2001, Seeman *et al.* 2004). Con base en esos estudios, otras referencias de análisis y la disponibilidad de materiales en el país, se hicieron algunas adaptaciones al nuevo método de trabajo.

3.1.1 Determinación del refrigerante

La literatura señala que una posible forma de preservar la muestra de orina es la utilización de un refrigerante que mantenga la muestra a una temperatura igual o menor a cuatro grados Celsius durante el periodo de colecta. En el caso del proyecto CRELES este periodo es de 12 horas, y a eso se le suma el tiempo desde que se entrega el recipiente, hasta que este se recoge el día siguiente. En total el tiempo que se requiere el refrigerante para mantener la muestra preservada es de aproximadamente 24 horas. Por esta razón se realizó una prueba de durabilidad de dos refrigerantes que estaban disponibles para la compra (hielo seco y en gel) y se evaluó su idoneidad de acuerdo con los requerimientos del mantenimiento de las muestras en el proyecto CRELES.

Para ello se realizó un ensayo con dos recipientes de plástico con capacidad para 1920 ml (TX-1/2G, Proplax) colocados dentro de un material aislante del calor, y en el que se encontraba también el refrigerante a evaluar en cada caso.

El hielo en gel estaba empacado en bolsas de diferentes tamaños pertenecientes a distintas casas comerciales extranjeras (Cold Pack, Glaciar Ice, Cold Ice, Re-Freez-R-Brix); las bolsas cubrían en su totalidad la superficie del recipiente de plástico, tal y como se observa en la figura ocho. El hielo seco empleado, era un bloque de tres kilogramos que se colocó junto a la botella y se adquirió en la empresa Florida Bebidas.

A cada botella de plástico se le adicionaron 250ml de agua a 37°C cada cuatro horas aproximadamente, para simular la adición de orina en condiciones normales de colecta de muestra. El agua se calentó en horno microondas durante 30 segundos y se reguló hasta obtener la temperatura deseada, utilizando agua fría. La medición se realizó con un termómetro VWR Scientific (cat No. 61010-020) con una escala entre -20°C y 110°C.

Se midió la temperatura ambiente y de la muestra cada hora, durante 12 horas; en la medición de la muestra se introdujo el termómetro durante 10 segundos y se elevó luego a la altura de los ojos para determinar la marca del mercurio.

A continuación se hicieron observaciones cada tres horas para determinar el tiempo en el que cada refrigerante se descongelaba por completo.

Para determinar si existían diferencias entre las propiedades de las marcas de hielo gel extranjeras y nacionales, que influyeran en las condiciones de colecta durante el proyecto CRELES, se evaluaron las características de una marca de hielo gel que facilitó un proveedor nacional (Ice Pack) comparando este con las características del hielo gel de algunas de las marcas que se importan al país (Cold Pack, Glaciar Ice, Cold Ice, Re-Freez-R-Brix).

En este caso se emplearon también los recipientes de plástico de Proplax (TX-1/2G) que se colocaron dentro de hieleras de estereofón cilíndricas de 20,5cm de altura y 21,5cm de diámetro (Termopor). Las botellas se cubrieron en su totalidad por las bolsas congeladas de hielo gel de las marcas a evaluar y hasta completar la capacidad de las hieleras de estereofón, tal y como se observa en la figura ocho:

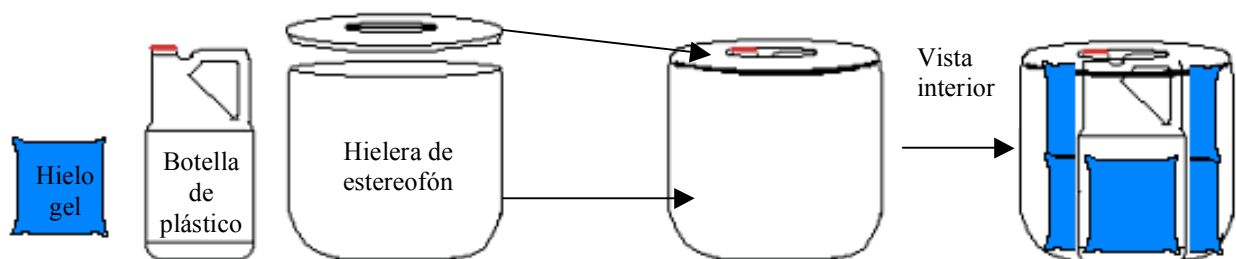


Figura 8. Diagrama del ensamblaje del recipiente para la colecta de las muestras de orina del proyecto CRELES.

Se realizaron observaciones cada tres horas durante 24 horas, para monitorear el comportamiento del hielo gel de las diferentes marcas. Al igual que en el ensayo anterior, se adicionaron 250ml de agua a 37°C, simulando la colecta de orina.

3.1.2 Determinación del preservante

Puesto que en estudios previos que otros autores han realizado se han encontrado diferencias en relación con el preservante utilizado, se llevaron a cabo algunas pruebas para determinar si se utilizaría algún refrigerante, si se emplearía ácido clorhídrico 6N, ambos o ninguno de estos preservantes para el mantenimiento de la muestra durante la colecta.

Se evaluó la orina de cuatro individuos voluntarios (todos mayores de 60 años, dos de ellos varones). Los voluntarios recogieron su orina por la noche durante 12 horas (de 6 de la tarde a 6 de la mañana). La colecta se realizó con las mismas personas en cuatro días distintos, pero con diferentes condiciones de preservación:

Cuadro 1. Condiciones de preservación de las muestras por evaluar

Condición de la colecta
Sin refrigeración sin ácido
Sin refrigeración con ácido
Refrigerada sin ácido
Refrigerada con ácido

Las muestras refrigeradas durante la colecta, se recogieron en una botella plástica cubierta con bolsas de hielo gel, que se introdujo en una hielera de estereofón. Las muestras que se colectaron con ácido, tenían 15 ml de HCl 6N dentro de la botella, previo a la colecta (según BAS 2001).

Los recipientes se entregaron debidamente etiquetados en cada uno de los días de evaluación, y las muestras fueron recogidas por los técnicos la mañana siguiente de cada día de colecta.

Aquellas muestras que fueron colectadas sin ácido, se separaron y trataron diferencialmente previo a su almacenamiento. La mitad del volumen de cada muestra se conservó sin el ácido, y a la otra mitad se le adicionó HCl 6N, hasta alcanzar pH 2.

Se almacenaron en el congelador de -20°C hasta que se tuvo estandarizado y validado el método de análisis (según se describirá en el siguiente apartado). Algunas réplicas de

esas muestras, se colocaron en refrigeración (aproximadamente cuatro grados Celsius) con el objetivo de evaluar la estabilidad de las catecolaminas según la condición de almacenamiento.

Para analizar si hubo variación entre los tratamientos de colecta, se llevó a cabo un análisis de varianza (SPSS 8.0). También se aplicó ANOVA para determinar variaciones entre las muestras almacenadas en el congelador y las que se mantuvieron en refrigeración previo al análisis.

3.2 Pruebas analíticas

Para el análisis y la medición de catecolaminas en orina de adultos mayores se empleó el kit con el código MF-9020 de la casa comercial Bioanalytical Systems Inc. (BAS 2001) el cual, de acuerdo con esta compañía, elimina la interferencia que causan la mayoría de los medicamentos y otros contaminantes presentes en las muestras de orina.

El protocolo propuesto en el manual de instrucciones de esta casa comercial (MF-9056)(BAS 2001), se adaptó a las condiciones y al cromatógrafo con que cuenta el Programa de Investigación en Neurociencias (Detector Electroquímico: Waters 464 Pulsed; Bomba: Waters 515 HPLC; Controlador de temperatura: BAS LC-22C).

Al inicio de cada apartado en esta sección, se describen las condiciones iniciales de análisis, tal y como lo recomienda el manual de instrucción del kit; posteriormente se detallan las pruebas realizadas que modifican o confirman el empleo de estas condiciones en el laboratorio. Las pruebas de las secciones subsiguientes en cada caso, incorporan los mejores resultados de las pruebas que les preceden.

3.2.1 Preparación de las sustancias empleadas en los análisis

3.2.1.1 Mezcla de orina

Se solicitó a voluntarios entre 18 y 45 años de edad que colectaran sus muestras de orina en recipientes plásticos que contenían 10ml de ácido clorhídrico 6N. Todas las muestras se mezclaron en un solo recipiente, hasta que se obtuvo un volumen aproximado de 1000ml. La mezcla de orina se mantuvo en refrigeración (aproximadamente cuatro grados Celsius) y se homogenizó con agitación antes de tomar una muestra en cada evaluación. La orina acidificada se utilizó por recomendación de la casa Bioanalytical Systems (BAS 2001).

3.2.1.2 Estándares

Solución estándar de trabajo

Esta solución contiene no sólo epinefrina y norepinefrina que son de interés para el estudio CRELES, sino que además incluye la dopamina, que es también una catecolamina y que podría también medirse en orina con el protocolo que se está probando.

Se pesaron cuantitativamente 45.50 ± 0.10 mg de epinefrina Bitartrato y 76.80 ± 0.10 mg de norepinefrina Bitartrato. Estas cantidades fueron transferidas a un balón aforado de 25.0 ml. Las sustancias se disolvieron y diluyeron en una solución de ácido acético 0.5 M preparada previamente. Se transfirió cuantitativamente un mililitro de la solución preparada a un balón aforado de 100.0 ml.

Por otra parte se pesaron 12.38 ± 0.10 mg de dopamina HCl, que fueron transferidos cuantitativamente al mismo balón aforado de 100.0ml. Las sustancias se disolvieron y mezclaron en ácido acético 0.5 M. Como resultado, la solución estándar de trabajo contenía 10 µg/ml de epinefrina, 15 µg/ml de norepinefrina y 100 µg/ml de dopamina.

Esta solución estándar (también llamada solución patrón) es utilizada para evaluar el estado del sistema de detección, los tiempos de retención las sustancias, e incluso puede utilizarse eventualmente como calibrador.

Solución Madre de Estándar interno

Los estándares internos en cromatografía son sustancias con estructura química similar a las sustancias que se están evaluando. Se utilizan para compensar algún nivel de degradación y como control de la respuesta de los picos y de la calidad de las muestras. En el caso de la detección electroquímica de catecolaminas en cromatografía líquida, el estándar interno más comúnmente utilizado es Dihidroxibencilamina o DHBA. Para su preparación se pesaron 15.82 ± 0.10 mg de DHBA•HBr y se transfirieron cuantitativamente a un balón aforado de 100.0ml. El polvo se disolvió con ácido acético 0.5 M y se aforó. Esta solución contenía 100 µg/ml de DHBA.

Estándar interno, solución de trabajo

Se preparó a partir de la solución madre de estándar interno, desde donde fueron transferidos 10ml a un balón aforado de 100.0ml. Se aforó con ácido acético 0.5M, para obtener una solución de 10 µg/ml de DHBA.

Solución de estándar acuoso

Se transfirieron 50 µl de la solución estándar de trabajo a un balón aforado de 10.0ml, al que también se le adicionaron 100 µl de estándar interno solución de trabajo. La solución se aforó utilizando para ello agua destilada. Esta solución tiene concentraciones de 50 ng/ml de epinefrina, 75 ng/ml de norepinefrina, 100 ng/ml de DHBA y 500 ng/ml de dopamina.

3.2.1.3 Calibradores

En la cromatografía y otros métodos de análisis, generalmente se realiza una cuantificación comparativa en la que se tiene como patrón una muestra (o conjunto de muestras) con concentraciones conocidas. Cuando se utilizan varias muestras, se elabora una curva multipuntos que se emplea como un patrón, que resulta más confiable para la medición, y permite a su vez corroborar la linealidad del método.

En este caso, las curvas de calibración se realizaron a partir de varias muestras con concentraciones conocidas de las sustancias por evaluar.

Inicialmente se preparó una solución acuosa a una concentración de 150 ng/ml de Epinefrina, 225 ng/ml de Norepinefrina y 1500 ng/ml de Dopamina. El volumen de ésta solución inicial (Calibrador uno) fue de 10ml. Posteriormente se realizaron diluciones sucesivas 1:1, es decir, que se tomaron cinco mililitros del Calibrador uno y se le adicionaron cinco mililitros de agua destilada hasta alcanzar 10ml, para obtener el Calibrador dos; de este último se tomaron cinco mililitros a los que se le adicionaron cinco mililitros de agua para obtener el calibrador tres y así sucesivamente hasta preparar el Calibrador seis.

Las concentraciones de los calibradores preparados son las siguientes:

Cuadro 2. Concentración de las catecolaminas en los calibradores preparados

Calibrador	Concentración (ng/ml)		
	<i>Epinefrina</i>	<i>Norepinefrina</i>	<i>Dopamina</i>
1	150	225	1500
2	75	112.5	750
3	37.5	56.3	375
4	18.8	28.1	187.5
5	9.4	14.1	93.8
6	4.7	7.0	46.9

También se prepararon calibradores en los que se sustituyó el agua destilada por orina acidificada proveniente de la mezcla de orina. El procedimiento que se siguió para prepararlos fue el mismo que se utilizó al preparar los calibradores acuosos.

3.2.2 Cálculo de la concentración de catecolaminas según la respuesta obtenida

El cálculo de la concentración de la muestra incógnita es dependiente de la respuesta (área o altura del pico) de la catecolamina que se está evaluando, en comparación con un estándar de concentración conocida o calibrador.

El cálculo de la concentración se lleva a cabo con la siguiente ecuación:

$$C = \frac{(S \times U)}{P}$$

Donde: C: Concentración de la catecolamina en la incógnita

S: Concentración conocida de la catecolamina en el calibrador

U: Respuesta de la catecolamina en la incógnita

P: Respuesta de la catecolamina en el calibrador

En el laboratorio del Programa de Investigación en Neurociencias este cálculo se lleva a cabo en el software de integración conectado al cromatógrafo (Chromatography Station for Windows CSW32), el que, una vez que se ha programado para utilizar los datos adecuados captados desde el detector, despliega el resultado del cálculo automáticamente, así como los cromatogramas correspondientes a cada muestra inyectada.

3.2.3 Elaboración de las curvas de calibración

Se elaboraron curvas lineales empleadas como patrones de calibración en la determinación de la concentración de catecolaminas. Las curvas se elaboraron con la inyección de los calibradores preparados según se describe en el apartado 3.2.1.3.

En el gráfico que se elabora a partir de éstos calibradores, los puntos de la curva corresponden a valores de respuesta (mV) en el eje de las y, y concentración de las catecolaminas (ng/ml) en el eje de las x; se trazó posteriormente una línea de mejor ajuste entre los puntos, y se calculó en cada caso el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

Las curvas se realizaron con los calibradores dos, tres, cuatro y cinco. No se utilizó el calibrador uno, pues tenía una concentración tal, que los picos de las sustancias sobrepasaban el rango de detección, tampoco se empleó el calibrador seis, ya que mostraba concentraciones tan bajas (sobre todo de epinefrina) que no eran detectables por el aparato.

3.3 Extracción en fase sólida (EFS)

3.3.1 Condiciones iniciales de trabajo

Con el objetivo de limpiar la muestra de orina de los contaminantes que interfieren en la detección de las catecolaminas, se realizó una extracción en fase sólida previa a la inyección de la muestra en el cromatógrafo.

Los cartuchos o columnas, así como los reactivos para la extracción (Reactivo A: Solución de Pretratamiento de catecolaminas en orina; Reactivo B: Solución de lavado de columna uno; Reactivo C: Solución de lavado de columna dos; Reactivo D: Solución de elusión), están incluidos dentro del kit de BAS, y las condiciones iniciales de trabajo son las que se describen en el manual de instrucción de este kit.

Para la extracción se empleó además una cámara (Vac Elut 20, Varian) (figura nueve) y una bomba para generación de vacío (Gast, Modelo DOA-V152-AA)

Antes de iniciar con el proceso de extracción, cada muestra de orina se dejó descongelar a temperatura ambiente y se agitó durante 10 segundos con un vórtex (Phoenix AP56) a velocidad cinco, con el objetivo de homogenizarla.

Se transfirió un mililitro de orina a un tubo de ensayo, al que además se le adicionó 20µl de la solución de trabajo de estándar interno y un mililitro del reactivo A. Ésta solución se homogenizó con el vórtex durante 10 segundos, y utilizando la misma velocidad de agitación.

Después de colocar adecuadamente las columnas de extracción por emplear (BAS, lote #3002604) en la cámara de vacío (según la hoja de instrucción de extracción con Manifold, Varian) (figura nueve), se colocaron dos mililitros de metanol en cada cartucho y se encendió la bomba, de manera que se tuviera un flujo de elusión de aproximadamente un mililitro/minuto (la regulación del flujo se realizó en la válvula de salida).

Antes de que el metanol terminara de eluir, se agregaron dos mililitros de reactivo B, que eluyeron también a un flujo de un mililitro/minuto.

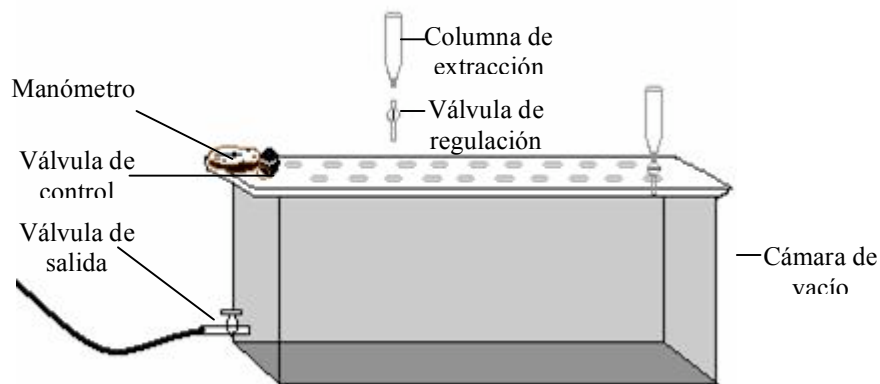


Figura 9. Diagrama de la cámara de vacío y colocación adecuada de las columnas de extracción.

A continuación se adicionó a cada cartucho la mezcla preparada previamente con la muestra de orina y el reactivo A, en este caso también se siguió aplicando vacío para la elusión.

De seguido se hicieron pasar otros dos mililitros de reactivo B, y posteriormente dos mililitros de reactivo C, siempre al mismo flujo.

Finalmente se adicionaron dos mililitros de reactivo D en cada cartucho, los cuales se colectaron en un nuevo tubo de ensayo. (Antes de este paso, todos los líquidos eluidos fueron desechados).

En todos los casos se evitó siempre el paso de aire a través de la columna (excepto al final del proceso para extraer todo el eluyente D).

3.3.2 Estabilidad de las muestras con previa EFS

Se preparó una muestra de solución estándar acuoso, a partir de la cual se tomaron cinco muestras que fueron procesadas con EFS. De igual manera se hicieron pasar cinco muestras del pool de orina a través de las columnas de extracción.

La totalidad de las muestras fueron analizadas el día de la extracción y se colocaron de inmediato en el refrigerador. Una semana después se evaluaron nuevamente.

Para determinar las posibles diferencias estadísticas entre los grupos, se llevó a cabo un análisis de varianza.

3.4 Condiciones del sistema de cromatografía para el análisis de catecolaminas

3.4.1 Condiciones iniciales de trabajo

Detector Electroquímico	Waters 464 Pulsed
Bomba	Waters 515 HPLC
Columna de separación	Incluida en el kit BAS (ODS; MF-6213-CL)
Fase móvil	Incluida en el kit BAS (CF-1102); se recirculó
Flujo	un mililitro/minuto
Volumen del loop	50 μ l
Volumen inyectado	100 μ l
Temperatura de la columna de separación	40 °C
Controlador de temperatura	BAS LC-22C
Integración	Por estándar interno
Determinación de la respuesta	Por área del pico
Potencial aplicado	600 mV
Intensidad de corriente del electrodo de trabajo	20 nA

3.4.2 Evaluación del potencial e intensidad de corriente aplicada en la detección

La literatura señala que las catecolaminas son detectables en rangos que van desde 550mV hasta 800mV, razón por la que se evaluó la influencia de esa variación del potencial y de la sensibilidad o intensidad de corriente, en la respuesta y detección de las concentraciones de las catecolaminas.

Para ello se inyectó una muestra del estándar acuoso en cada una de las siguientes condiciones:

Cuadro 3. Planteamiento de evaluación de distintas intensidades de corriente y potencial de trabajo en el detector electroquímico.

Intensidad de corriente (nA)	Potencial (mV)
20	700
10	700
20	800
10	600
20	600

No se probó la inyección a 10 nA y 800 mV pues a esa sensibilidad y con las concentraciones de las sustancias utilizadas en el análisis, los picos generados estarían fuera del rango de detección.

Se evaluó la respuesta obtenida en cada caso con base en la altura de los picos en los cromatogramas (como excepción a lo que se proponía en las condiciones iniciales de trabajo).

3.5 Valor estadístico del ensayo y otras condiciones

3.5.1 Variación entre días

Para evaluar la variación del ensayo entre los días se inyectó:

- a) la solución de estándar acuoso
- b) esa misma solución pero una vez que se ha hecho pasar a través de las columnas de extracción en fase sólida
- c) la mezcla de orina.

De cada una de estas muestras se hicieron cinco inyecciones diarias durante tres días consecutivos.

Para evaluar si hubo diferencias significativas entre los días de medición se realizó un análisis de varianza con los datos de concentración de las muestras. Los cálculos de la concentración de todas las muestras inyectadas se realizaron por estándar externo contra una curva de calibración lineal.

3.5.2 Estabilidad de los calibradores

Una prueba adicional se llevó a cabo para evaluar la estabilidad de los calibradores en el tiempo. Así, se prepararon calibradores acuosos en el día uno, y se inyectaron ese mismo día, se inyectaron también en el día dos y el día tres después de la preparación. La respuesta (altura de los picos) obtenida, se comparó entre los días mediante un análisis de varianza.

3.5.3 Repetibilidad

Un sistema de medición es repetible si múltiples mediciones de exactamente la misma parte son iguales o muy parecidas. Para evaluar la repetibilidad del ensayo se inyectó:

- d) la solución de estándar acuoso
- e) esa misma solución pero una vez que se ha hecho pasar a través de las columnas de extracción en fase sólida
- f) la mezcla de orina.

De cada una de estas muestras se hicieron 15 inyecciones para evaluar la repetibilidad del ensayo, así como la posible variación de esa repetibilidad según la matriz empleada. De las 15 inyecciones se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

$$\text{Promedio } (\bar{X}) = \frac{\sum n}{n}$$

$$\text{Desviación estándar (DS)} = \sqrt{\frac{\sum (X - x)^2}{n - 1}}$$

$$\text{Coeficiente de variación (CV)} = \frac{DS}{\bar{X}} \times 100$$

Los cálculos de la concentración de todas las muestras inyectadas se realizaron por estándar externo contra una curva de calibración lineal según se describe en el apartado 3.2.3.

3.5.4 Exactitud

La exactitud se entiende como la habilidad del instrumento de medición para obtener, en promedio, una medida que es igual al valor verdadero.

Para probar que el aparato y la técnica utilizada para la medición son confiables, se realizó una prueba en la que se determinó la exactitud de la medición. Se elaboró una curva lineal con los calibradores acuosos.

Se hicieron 15 inyecciones de una muestra estándar acuosa, cada una de las inyecciones, así como el promedio de éstas, se compararon contra la curva de calibración.

La exactitud se calculó con la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\text{Valor esperado} - \text{Valor obtenido}}{\text{Valor esperado}} \times 100$$

3.5.5 Linealidad

Se refiere a la consistencia de las mediciones bajo un rango de valores verdaderos. Se evaluó la linealidad alcanzada con:

- a) los calibradores acuosos sin previa extracción
- b) los mismos calibradores pero que incorporaron el proceso de EFS
- c) en los calibradores de orina.

Además se realizaron las curvas lineales de estas sustancias en dos días consecutivos con las muestras preparadas en el primer día, esto con el objetivo de evaluar a través del tiempo, la estabilidad de los calibradores preparados.

3.6 Variantes planteadas al método de trabajo de acuerdo con los resultados obtenidos

3.6.1 Determinación del porcentaje de recuperación

Se probaron distintas columnas de extracción, para evaluar si la respuesta obtenida variaba según el lote al que éstas columnas pertenecían. Para ello se evaluó el porcentaje de recuperación de las catecolaminas después de la extracción con cada lote utilizado.

Se efectuó el procedimiento de extracción del estándar acuoso simulando el proceso de EFS que debe realizarse con las muestras de orina. Se realizaron extracciones con los tres diferentes lotes enviados desde la casa comercial que distribuye el kit, y se inyectaron para su detección en el HPLC. También se hicieron mediciones de muestras del estándar acuoso sin extracción previa. En cada caso se hicieron cinco inyecciones. El porcentaje de recuperación en cada catecolamina se obtuvo de la siguiente manera:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Promedio de catecolamina en el acuoso con previa EFS}}{\text{Promedio de la catecolamina en el acuoso sin EFS}} \times 100$$

3.6.2 Velocidad de elusión en el proceso de extracción

Los resultados obtenidos previamente y la experiencia de otros laboratorios* demuestran la criticidad de la velocidad de elusión en el éxito de la EFS. Por esta razón se planteó la modificación del método inicial de EFS en el que aplicaba vacío en todo el proceso, para ello:

Se evaluó el porcentaje de recuperación de las catecolaminas y el estándar interno, al eliminar parcialmente la aplicación de vacío. Se hicieron 10 mediciones de la extracción con el lote 3002103. Cinco de ellas se obtuvieron con las condiciones recomendadas en el manual de instrucción. A las otras cinco no se les aplicó vacío en el proceso de elusión del metanol, la mezcla del acuoso con A, y los reactivos B y C. Se aplicó vacío al terminar la

* Baudrit, O. 2004. Extracción en fase sólida. (Comunicación personal) Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica.

elusión de los dos mililitros del reactivo C (para asegurar la extracción de todo el líquido) y al comienzo de la elusión del reactivo D. En cada caso se obtuvo el promedio de las concentraciones de catecolaminas detectadas en el aparato y el porcentaje de recuperación, basado en el promedio de cinco inyecciones de la misma solución de estándar acuoso sin la extracción ya descrita.

Se determinó además el tiempo promedio de extracción según el procedimiento empleado en cada caso.

3.6.3 Cantidad de eluente D colectado al final del proceso de EFS

Si bien las modificaciones planteadas previamente resultarían provechosas (según se verá en los resultados), se hizo necesario variar también la concentración de la solución inyectada (eluente D), con el objetivo de lograr una mejor detección de las catecolaminas en las muestras de orina.

Se inyectaron muestras de soluciones estándar acuosas que se colectaron en dos mililitros, un mililitro y 0.5ml del eluente D durante el proceso de EFS, y se determinó el porcentaje de recuperación en cada caso. También se evaluó la respuesta lograda en los cromatogramas de muestras de la mezcla de orina, que se colectaron de igual forma con volúmenes de dos mililitros, un mililitro y 0.5ml del reactivo D.

Se eluyó un mililitro adicional del reactivo D, posterior a la extracción, con el objetivo de evaluar si al disminuir el volumen colectado (ya no dos mililitros sino un mililitro o 0.5ml) dejarían de extraerse catecolaminas porque éstas se mantenían adheridas a la columna de extracción.

3.6.4 Flujo y temperatura de la columna de separación

La necesidad de obtener un procedimiento más eficiente, con tiempos de corrida menores y con una separación confiable entre las sustancias evaluadas, llevó al planteamiento de modificaciones en el flujo de corrida y temperatura de la columna de separación.

Se hicieron algunas pruebas que tenían como objetivo evaluar en cada caso el tiempo total de la corrida del cromatograma, la separación entre los picos de Epinefrina, Norepinefrina y Dopamina, y las posibles variaciones causadas por la separación lograda.

Se inyectaron tres muestras de solución estándar acuosa en cada una de las siguientes condiciones:

Cuadro 4. Condiciones de evaluación en el aparato de medición (HPLC).

Flujo (ml/min)	Temperatura de la columna (°C)
1.0	Temperatura ambiente
1.0	28
1.0	40
1.5	28

Primero se llevaron a cabo las pruebas en las que se evaluó la variación causada por la temperatura en la columna de separación, cuando se encontró la temperatura óptima, se procedió a evaluar la variación causada por el flujo de inyección. Se realizó un análisis de varianza para determinar estadísticamente esa variación en ambos casos.

3.6.5 Método de calibración

Para determinar posibles variaciones por calibración con estándar interno o externo, se inyectaron 18 muestras de la solución estándar acuosa. Seis de ellas se emplearon como patrones de calibración. De las 12 restantes, la mitad se evaluó contra calibradores por estándar externo, y las otras con esos calibradores por estándar interno. Se evaluó si hubo diferencias significativas entre ellos por medio de un análisis de varianza.

Posteriormente se inyectó una solución acuosa a la que se le realizó el proceso de EFS. Al inyectarla y analizarla en el HPLC se calibró por estándar externo, con una integración que considera el área de los picos, y sobre la misma inyección, otra integración que considera la altura de estos.

Para ésta solución acuosa, se obtuvo el porcentaje de recuperación logrado al utilizar una u otra variable de integración.

3.7 Prueba piloto

Una vez que se definieron los protocolos de trabajo del PIN e implementaron las modificaciones necesarias como resultado de las pruebas realizadas, se llevó a cabo un experimento piloto con 15 individuos incluidos dentro de la muestra seleccionada para el proyecto CRELES. Con los resultados obtenidos, se determinó la precisión del método estandarizado.

La selección de la muestra de CRELES, se realizó a partir del Censo Nacional del 2000 en el que se seleccionaron al azar 8000 individuos mayores de 60 años al momento del

censo, de esos 8000 se realizó un muestreo estratificado por edad (con un sobre-muestreo de los individuos con 80 años y más) de donde se eligieron 3000 individuos distribuidos en 50 áreas de salud (según sistema nacional de salud) y ubicados en el área metropolitana del país (80%) y en el resto del país (20%).

A todos los individuos que participaron en esta prueba piloto se les solicitó la firma de un consentimiento informado, tal y como se hará con todos los demás voluntarios que eventualmente participarán en el proyecto. El proyecto y las pruebas que se llevan a cabo fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Costa Rica.

4. RESULTADOS

Se muestran a continuación los resultados obtenidos en cada una de las pruebas en las distintas etapas de estandarización.

4.1 Determinación del refrigerante

Tal y como se puede observar en la figura 10, en todas las mediciones realizadas, el hielo seco permite el mantenimiento de la muestra a temperaturas más bajas de las que se logran con el hielo gel. El hielo seco hace que la muestra se mantenga congelada en la mayor parte del periodo analizado, esto a pesar de que la prueba se realizó con un bloque y no con hojuelas que permitieran cubrir toda la superficie del recipiente colector. El bloque se sublimó por completo al cumplir 33 horas desde el comienzo de la evaluación, mientras que en el caso del hielo en gel la temperatura mínima obtenida fue de cuatro grados Celsius, y se descongeló por completo al cumplir 20 horas fuera del congelador.

Los picos observados a las cuatro, ocho y doce horas corresponden a las simulaciones de orina colectada, tal y como se describió en el apartado correspondiente de materiales y métodos. Este comportamiento en los refrigerantes se presentó en rangos de temperatura ambiental entre los 20,0 y 24,5 °C.

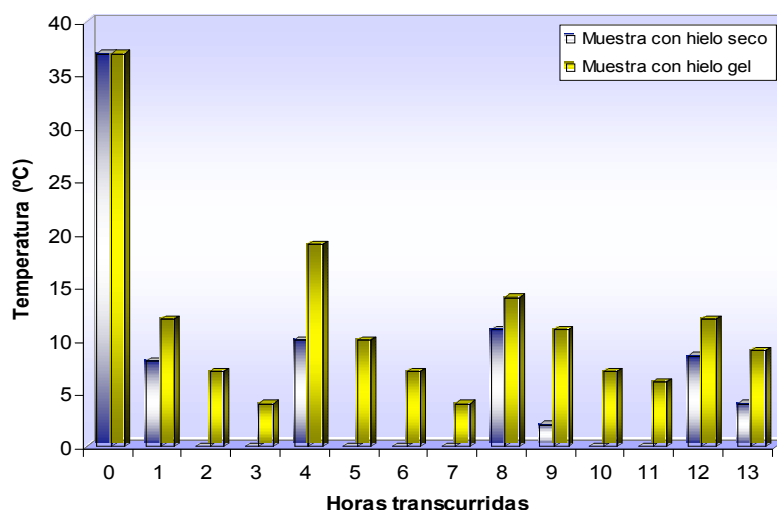


Figura 10. Evaluación de la temperatura de muestras colectadas con distintos refrigerantes.

Cuando se evaluaron las marcas del hielo gel disponibles en el mercado nacional, se encontró que la marca Ice Pack tiene un comportamiento en el tiempo muy semejante a las otras marcas de proveedores extranjeros. Después de 24 horas, todas las bolsas con hielo

gel se habían descongelado por completo, sin embargo la temperatura de la muestra aún se mantenía alrededor de los cinco grados Celsius, tal y como se observa en la figura 11. La temperatura ambiental durante el ensayo osciló entre los 22.0 °C y 28.5 °C.

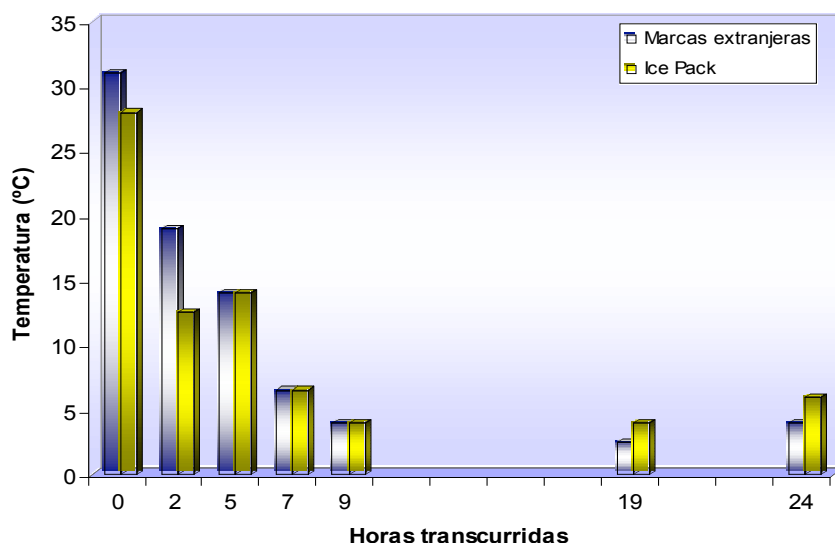


Figura 11. Evaluación de la temperatura de muestras colectadas con distintas marcas de hielo gel.

4.2 Determinación del preservante

Al hacer el análisis de varianza, se encontró que no existe diferencia significativa en las concentraciones detectables según el tratamiento utilizado para el mantenimiento de la muestra durante la colecta ($\alpha= 0.621$ para epinefrina) ($\alpha= 0.916$ para norepinefrina) ($\alpha= 0.935$ para dopamina). El promedio de los valores obtenidos por cada tratamiento se presenta en el cuadro cinco.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de las catecolaminas según las condiciones de almacenamiento previo al análisis (Procedimiento descrito en el apartado 3.1.2). Los resultados del análisis de varianza en esta prueba fueron: $\alpha= 0.185$ para epinefrina; $\alpha= 0.630$ para norepinefrina y $\alpha= 0.688$ para dopamina.

Cuadro 5. Promedio de la concentración de las catecolaminas según los tratamientos en la preservación de la muestra durante la colecta. Los valores están dados en ng/ml \pm Desviación estándar.

Tratamiento	Sustancia		
	<i>Epinefrina</i>	<i>Norepinefrina</i>	<i>Dopamina</i>
SRSA	2.98 \pm 1.71	8.78 \pm 7.93	57.90 \pm 66.32
SRSA + HCl	2.11 \pm 1.89	5.06 \pm 5.17	42.10 \pm 46.31
SRCA	1.60 \pm 0.78	7.67 \pm 1.96	59.61 \pm 25.50
CRSA	1.76 \pm 1.51	8.09 \pm 6.58	62.24 \pm 52.49
CRSA + HCl	1.92 \pm 0.89	8.25 \pm 3.67	65.92 \pm 41.58
CRCA	1.64 \pm 0.83	7.17 \pm 1.78	43.98 \pm 25.89

SRSA: Sin refrigeración, sin ácido

SRSA + HCl: Sin refrigeración, sin ácido (colecta) con adición de ácido previo almacenamiento.

SRCA: Sin refrigeración, con ácido

CRSA: Refrigerado, sin ácido

CRSA + HCl: Refrigerado, sin ácido (colecta) con adición de ácido previo almacenamiento.

CRCA: Refrigerada, con ácido.

A pesar de que estadísticamente no se encontraron diferencias entre los tratamientos, en la resolución de los cromatogramas y limpieza en la línea base sí se observó alguna variación, específicamente en los tratamientos sin refrigeración a los que no se les adiciona ácido durante la colecta, pero que antes de almacenarlos se llevan a pH dos con ácido clorhídrico. A manera de ejemplo, en la figura 12 se colocan varios cromatogramas de muestras de la misma persona, colectadas en diferentes condiciones, en donde se observa el comportamiento descrito. La figura no muestra el eje de la respuesta (voltaje) pues sólo pretende una comparación de la degradación o limpieza en los picos observados.

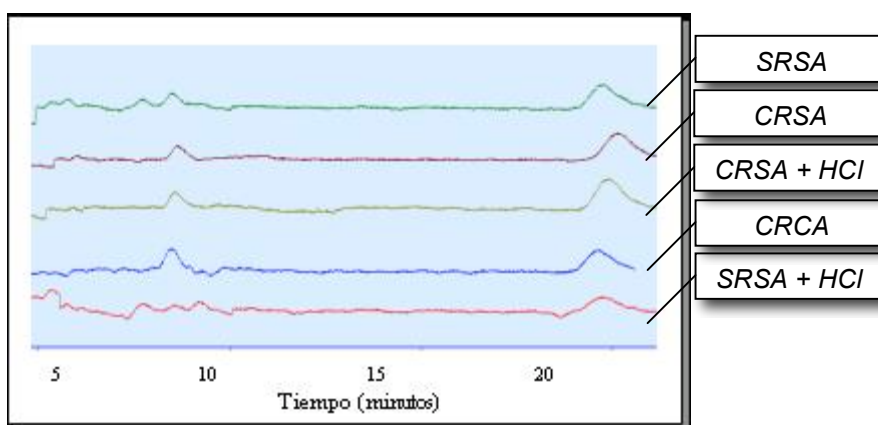


Figura 12. Comparación de la resolución y limpieza de los cromatogramas, según el tratamiento de colecta empleado en cada caso. **SRSA:** Sin refrigeración, sin ácido. **CRSA:** Refrigerado, sin ácido. **CRSA + HCl:** Refrigerado, sin ácido (colecta) con adición de ácido previo almacenamiento. **CRCA:** Refrigerada, con ácido. **SRSA + HCl:** Sin refrigeración, sin ácido + Ácido clorhídrico posterior a la colecta.

4.3 Extracción en fase sólida

Al llevar a cabo el proceso de extracción en fase sólida con las columnas del lote # 3002604 y en las condiciones propuestas en el manual de instrucción de BAS, no se obtuvo respuesta alguna en los cromatogramas de las muestras inyectadas, razón por la que se plantearon distintas pruebas (apartados 3.6.1, 3.6.2, 3.6.3) con el objetivo de mejorar la respuesta obtenida. Los resultados de dichas pruebas se muestran a continuación:

4.4 Determinación del porcentaje de recuperación

Tal y como se puede observar en la figura 13, se obtuvo una baja recuperación de todas las catecolaminas y del DHBA al utilizar el lote de columnas con el código 3022404; una recuperación mínima de Dopamina y nula de las otras sustancias evaluadas al utilizar el lote 3002604; y un porcentaje de recuperación más alto en todas las catecolaminas (entre 56,7% y 79,1%) al emplear las columnas del lote 3002103. En los lotes 3002103 y 3022404, se observa cómo el menor porcentaje de recuperación se presenta en el DHBA, y el mayor en la Epinefrina. En ambos casos hay también un bajo porcentaje de recuperación de Dopamina. Es necesario apuntar que, a pesar de que la mejor recuperación se obtiene con la Epinefrina, por las concentraciones esperadas de las sustancias en las muestras de orina por analizar, se hace necesario aumentar la recuperación, de manera que la concentración de la sustancia sea detectable por el cromatógrafo con el que se cuenta.

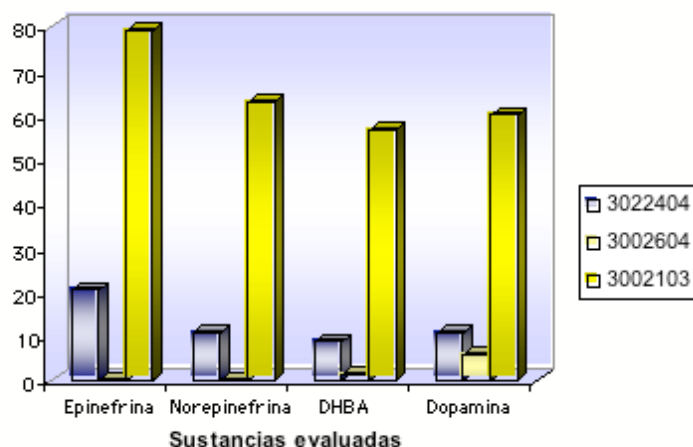


Figura 13. Porcentaje de recuperación en las catecolaminas según el lote de columnas empleado en la extracción en fase sólida y a un flujo de elusión de un mililitro/minuto.

Dado que el lote # 3002103 es en el que se presentan los mejores resultados en porcentajes de recuperación de las soluciones, todas las pruebas y análisis siguientes se realizaron con las columnas pertenecientes a este lote.

4.5 Velocidad de elusión en el proceso de extracción

Al eliminar la aplicación del vacío en prácticamente todo el proceso de extracción en fase sólida, se aumentó considerablemente el tiempo para llevar a cabo esta parte del procedimiento. El tiempo completo de extracción pasó de tardar aproximadamente 20 minutos, a cumplir alrededor de dos horas en cada bloque de muestras extraídas.

Eliminar el vacío durante la EFS permitió un aumento considerable en la recuperación de las sustancias del estándar acuoso, tal y como puede observarse con claridad en la figura 14.

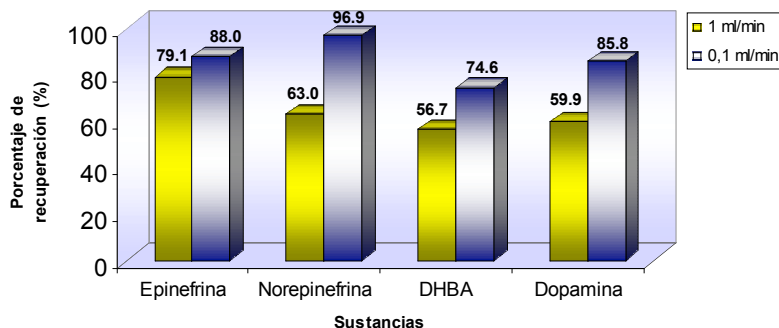


Figura 14. Porcentaje de recuperación obtenido al variar la velocidad de elusión en el proceso de EFS.

4.6 Cantidad de eluente D colectado al final del proceso de EFS

En la figura 15 se muestra cómo el porcentaje de recuperación de las catecolaminas y del DHBA disminuye al reducir de dos mililitros a un mililitro la cantidad de reactivo D que se colecta al final del proceso de extracción en fase sólida. Sin embargo, cuando se colectan 0.5ml, el porcentaje de recuperación, en Norepinefrina, DHBA y Dopamina aumenta en comparación con la recuperación obtenida en un mililitro de reactivo D, aunque sigue siendo menor que cuando se recogen dos mililitros. En el caso particular de la Epinefrina, el porcentaje de recuperación es menor cuando se colectan 0.5ml de D, aunque no significativamente. La recuperación que se logra de DHBA aumenta al recoger 0.5ml si se compara tanto con las muestras que se colectaron con dos mililitros como con las de un mililitro.

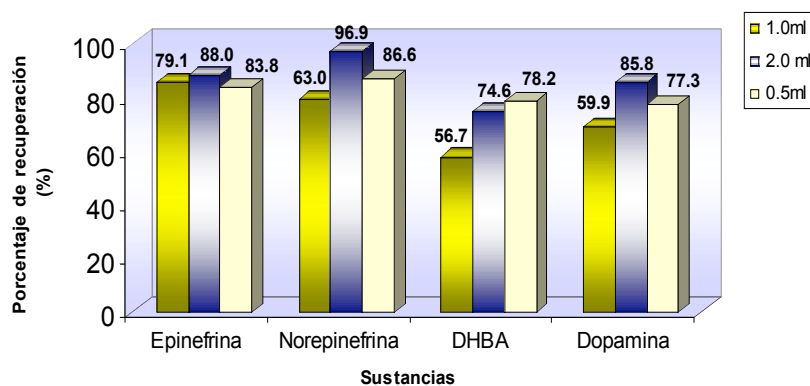


Figura 15. Porcentaje de recuperación obtenido en los estándares acuosos al variar el volumen de reactivo D que se colecta al final del proceso de EFS.

Por otro lado, al concentrar la muestra de la mezcla de orina, que ha sido procesada mediante EFS se tiene que, tal y como se observa en la figura 16, la mejor detección y en la que se logra reducir más el error en la integración, se logra cuando se recogen 0.5ml del reactivo D. En estas condiciones, todas las sustancias en las muestras de orina son detectables por el aparato, a diferencia de lo que ocurre cuando se colectan dos mililitros, en donde el pico de epinefrina es tan pequeño que no se distingue de otras fluctuaciones en la línea base.

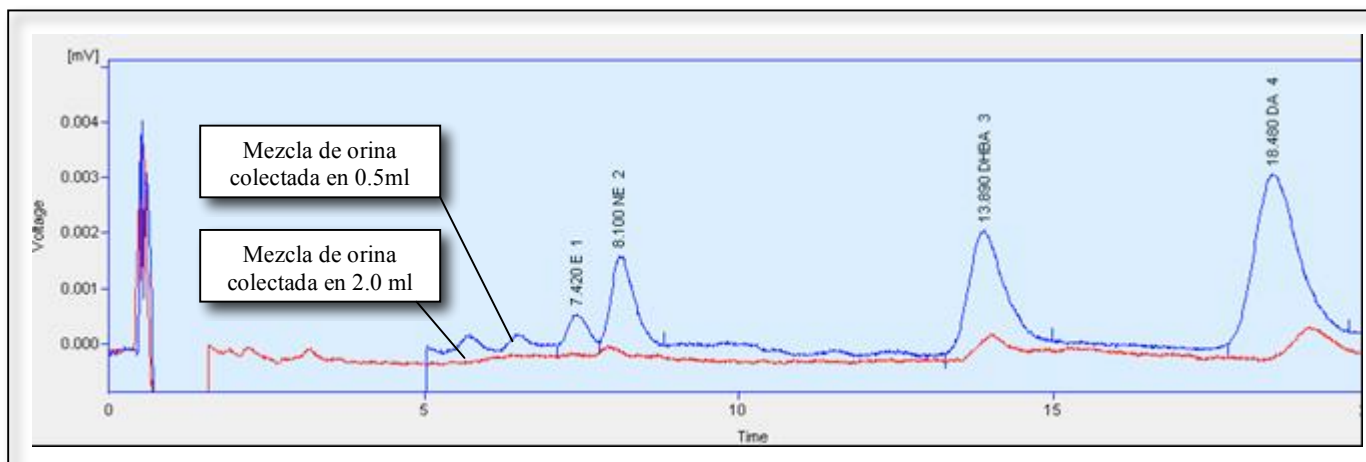


Figura 16. Variación en la detección de las catecolaminas de las muestras de orina según la cantidad de eluyente D que se colecta al final del proceso de EFS.

Al evaluar las posibles pérdidas de detección de catecolaminas, por emplear solamente un mililitro de D para recolectar la muestra que se está extrayendo, se observaron algunos residuos de Dopamina (5.54%), tal y como se puede observar en la figura 17.

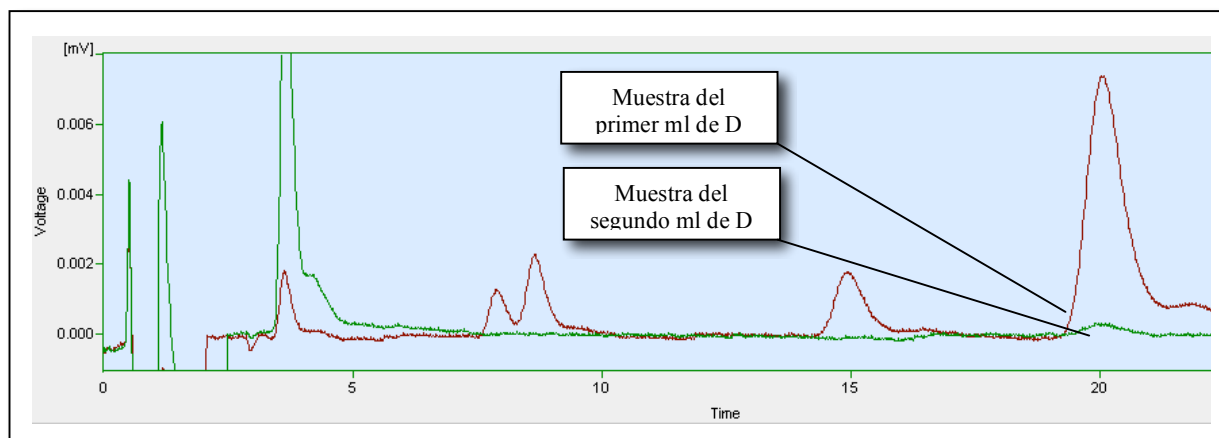


Figura 17. Respuesta de las catecolaminas obtenida al recoger tanto el primero como el segundo mililitro del reactivo D al realizar el proceso de extracción en fase sólida en muestras de estándar acuoso.

4.7 Estabilidad de las muestras con previa EFS

Los resultados obtenidos en este caso, permiten afirmar que las muestras de soluciones estándar acuosas extraídas, se mantienen estables aún después de siete días en

refrigeración (cuatro grados Celsius), pues no hay diferencia significativa en la respuesta de las catecolaminas al transcurrir ese periodo ($\alpha = 0.356$).

Tampoco se observan diferencias significativas en la respuesta de las catecolaminas de los calibradores preparados con la mezcla de orina ($\alpha = 0.410$), es decir que en este caso las muestras extraídas también se mantienen estables después de una semana en refrigeración.

4.8 Evaluación del potencial e intensidad de corriente aplicada en la detección

Al realizar las pruebas relacionadas con modificaciones del potencial e intensidad de corriente, se observó que en todos los cromatogramas que se corren en una intensidad de corriente de 10nA, el pico de la dopamina excede el rango de detección. Las muestras inyectadas a 20nA, y que se analizaron a 700mV y 800mV, son ligeramente más pequeñas (en altura) que las inyectadas a 600mV, aunque no significativamente. Las variaciones en las respuestas pueden observarse en el cuadro seis.

Cuadro 6. Diferencias en la detección de las catecolaminas según el potencial e intensidad de corriente aplicadas en el electrodo.

	Respuesta (mV)		
	700mV-20nA	800mV-20nA	600mV-20nA
Epinefrina	0.961	1.008	1.013
Norepinefrina	1.672	1.657	1.748
DHBA	1.734	1.801	1.852
Dopamina	6.015	6.436	6.553

4.9 Flujo y temperatura de la columna de separación

Al realizar las inyecciones de las muestras y de los calibradores con las condiciones iniciales de trabajo descritas en el apartado 3.4.1, se encontró que la sustancia con el menor tiempo de retención en este análisis es la epinefrina (siete minutos), seguida por la norepinefrina (ocho minutos y treinta segundos), un poco después se presenta en el cromatograma el estándar interno o DHBA (13 minutos) y finalmente aparece el pico de la dopamina (17.3 minutos).

Debido a la inyección repetida de muestras y a los cambios en la temperatura ambiente, se observaron modificaciones en los cromatogramas. Dichos cambios se reflejan principalmente en la unión de los picos de epinefrina y norepinefrina.

Se plantearon modificaciones al método inicial (apartado 3.6.4), y se observó que al modificar la temperatura de la columna de separación y el flujo durante el análisis, se presenta una amplia variación en los tiempos de las corridas, tal y como se puede observar en el cuadro siete y como se nota con claridad en la figura 18.

Cuadro 7. Tiempos de corrida de las muestras inyectadas, según el flujo y la temperatura de la columna de separación

Flujo (ml/min)	Temperatura de la columna (°C)	Tiempo de corrida (min)
1.0	Temperatura ambiente	44.0
1.0	28	40.5
1.0	40	20.0
1.5	28	30.0

Se observó una mayor separación entre los picos de epinefrina y norepinefrina, conforme se disminuyó la temperatura de la columna y el flujo de inyección. En la figura 18 se nota el comportamiento que se describe; no se muestra el eje del voltaje, pues los cromatogramas no están colocados sobre la misma línea base.

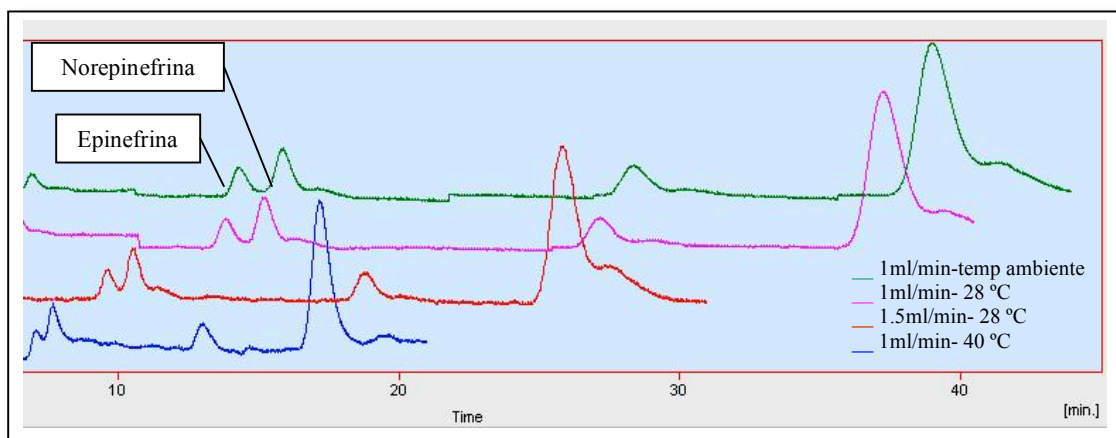


Figura 18. Separación de los picos en los cromatogramas y diferencias en los tiempos de retención y corrida de las soluciones, según la temperatura en la columna de separación y el flujo de inyección. Nótese el detalle de la separación observada en los picos de epinefrina y norepinefrina, así como el tiempo total de la corrida conforme cambian las condiciones.

A pesar de los cambios observados en los cromatogramas, las variaciones en la temperatura de la columna no alteran significativamente la respuesta para ninguna de las catecolaminas analizadas ($\alpha= 0.527$ para epinefrina; $\alpha= 0.086$ para norepinefrina y $\alpha= 0.176$ para dopamina).

En el cuadro ocho se presentan los promedios de las respuestas obtenidas según la temperatura en la columna de separación cuando se corrieron las muestras a un flujo de un mililitro por minuto.

Cuadro 8. Promedio de la concentración de las catecolaminas en muestras inyectadas a un flujo de un mililitro/minuto, cuando se varió la temperatura en la columna de separación. Los valores están dados en ng/ml \pm desviación estándar.

Temperatura de la columna	Epinefrina	Norepinefrina	Dopamina
Ambiente	77.20 \pm 2.66	116.25 \pm 4.20	777.12 \pm 26.77
28 °C	75.68 \pm 2.11	109.16 \pm 3.61	722.85 \pm 26.01
40 °C	75.37 \pm 0.83	111.26 \pm 0.87	749.13 \pm 37.74

Tampoco se encontraron diferencias significativas en la respuesta de los estándares acuosos cuando la temperatura de la columna se mantiene a 28 °C y se varía el flujo de la inyección. Los resultados del análisis de varianza en donde se compararon las muestras inyectadas a un mililitro por minuto y las inyectadas a 1.5ml/min fueron: $\alpha= 0.178$ para epinefrina; $\alpha= 0.111$ para norepinefrina y $\alpha= 0.104$ para dopamina.

4.10 Método de calibración

El bajo porcentaje de recuperación y las variaciones observadas en inyecciones sucesivas del estándar interno, hicieron que este método de calibración fuera poco confiable. Por ésta razón se hicieron las pruebas descritas en el apartado 3.6.5, de forma que se pudiera determinar si resultaría más acertado usar un calibrador de estándar externo o continuar utilizando un estándar interno. De las pruebas realizadas se obtuvieron los datos que se presentan en el cuadro nueve.

Cuadro 9. Promedio de la concentración de las catecolaminas en muestras analizadas por diferentes métodos de calibración. Los valores están dados en ng/ml \pm desviación estándar.

Método de calibración	Epinefrina	Norepinefrina	Dopamina
Por estándar interno	74.83 \pm 3.56	113.03 \pm 4.21	751.73 \pm 30.22

Por estándar externo	72.80 ± 5.69	109.77 ± 4.17	730.04 ± 30.54
----------------------	--------------	---------------	----------------

De acuerdo con el análisis de varianza realizado en este caso, no existe diferencia significativa en la detección de las sustancias si se utiliza como calibrador el estándar externo o el estándar interno (DHBA) ($\alpha = 0.378$ epinefrina) ($\alpha = 0.118$ norepinefrina) ($\alpha = 0.149$ dopamina).

También se realizó una evaluación en la que se inyectaron muestras acuosas y se utilizaron distintos métodos de integración (áreas o alturas). Se encontró que existen algunas diferencias en el porcentaje de recuperación logrado en cada caso, tal y como se puede observar en el cuadro 10.

Cuadro 10. Porcentaje de recuperación de la solución acuosa extraída de acuerdo con el método de integración.

Sustancia	Porcentaje de recuperación (%)	
	Usando área	Usando altura
Epinefrina	88.0	94.2
Norepinefrina	96.0	92.8
DHBA	74.6	78.1
Dopamina	85.8	87.5

4.11 Estabilidad de los calibradores

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza, los calibradores preparados se mantienen estables en refrigeración hasta por tres días, sin mostrar variaciones significativas en la concentración de las sustancias al transcurrir ese periodo ($\alpha = 0.985$)

4.12 Variación entre días

No existe una diferencia significativa entre los tres días de inyección para las soluciones estándar acuosas ($\alpha = 0.988$), para las acuosas con previa extracción en fase sólida ($\alpha = 0.969$), ni para las muestras de la mezcla de orina ($\alpha = 0.948$).

Los coeficientes de variación en todos los días, estuvieron por debajo del 20% en la mezcla de orina, menores al 10% en las soluciones acuosas con previa extracción, y menos del 4% en las soluciones estándar acuosas.

4.13 Repetibilidad

Las desviaciones estándar y desviaciones estándar relativas de las catecolaminas en las distintas soluciones, se encuentran en rangos tales que hacen que los resultados sean repetibles. Estos valores, así como el promedio de la medición, se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 11. Resultados obtenidos en las pruebas de repetibilidad para las distintas sustancias y según la matriz de la muestra inyectada.

	Epinefrina			Norepinefrina			Dopamina		
	Prom	DS	CV	Prom	DS	CV	Prom	DS	CV
Acuosa	48.73	1.99	4.08	73.98	2.59	3.50	498.17	18.55	3.72
Acuosa filtrada	40.32	1.42	3.52	62.62	2.28	3.64	371.39	17.28	4.65
Pool de orina	7.95	0.98	12.37	23.89	3.58	14.96	155.70	16.14	10.36

Prom: Promedio. El valor está dado en ng/ml.

DS: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación

4.14 Exactitud

De acuerdo con los resultados que se muestran en el cuadro 12, las pruebas realizadas en el laboratorio tienen una exactitud igual o superior al 97.5%, lo que significa que los resultados obtenidos en todos los casos son confiables para el investigador.

Cuadro 12. Exactitud del ensayo en la medición de catecolaminas

	Concentración esperada (ng/ml)	Promedio de concentración obtenida (ng/ml)	Porcentaje de error	Exactitud (%)
Epinefrina	50.00	48.73	2.5	97.5
Norepinefrina	75.00	73.98	1.4	98.6
Dopamina	500.00	498.17	0.4	99.6

4.15 Linealidad

La inyección y evaluación de los calibradores demostró que tanto en los estándares acuosos sin extraer, como en los que se hicieron pasar por el proceso de EFS, el ensayo es lineal en rangos que van desde 4.7ng/ml y 75ng/ml de epinefrina, 7.0 ng/ml y 112.5 ng/ml de norepinefrina, y de 46.9ng/ml y 750ng/ml de dopamina. Esta situación es semejante cuando se inyectaron los calibradores elaborados con la mezcla de orina (figura 19).

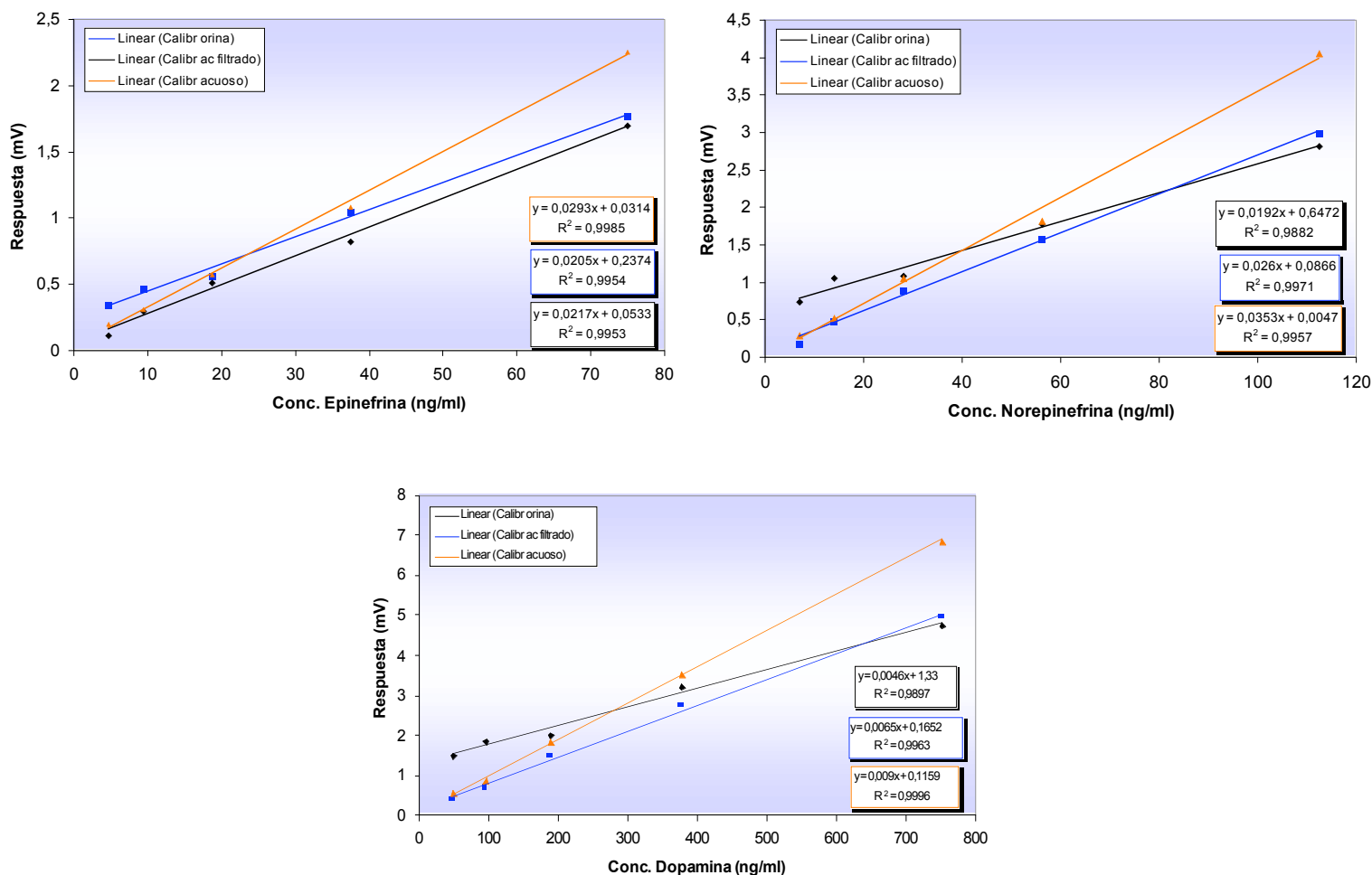


Figura 19. Linealidad observada en las curvas de calibración de las catecolaminas.

La evaluación de los calibradores que se llevó a cabo durante dos días consecutivos, no mostró amplias variaciones, todos los coeficientes de correlación (r^2) obtenidos en las inyecciones de los dos días estuvieron por encima de 0.9882 ($\alpha < 0.001$).

4.16 Pruebas piloto

Los resultados obtenidos en las pruebas piloto se encuentran dentro de los rangos para adultos mayores que reporta la literatura (cuadro 14). Según el estudio realizado por Seeman *et al.* (2004), el aporte de estas catecolaminas al aumento de la carga alostática, se presenta cuando la concentración de estas sustancias en las muestras de orina de la persona que se evalúa, está por encima de puntos de corte definidos estadísticamente. En los resultados de la prueba piloto, hubo dos personas que superaron el criterio de punto de corte en la concentración de epinefrina (mayor o igual a cinco microgramos por gramos de creatinina), y ninguna de las quince personas aportó a su carga alostática considerando el valor de la norepinefrina en orina (el punto de corte es una concentración mayor o igual a 48 g/g de creatinina)

Cuadro 14. Valores de las concentraciones de catecolaminas en 15 personas mayores de 60 años, colaboradoras en el proyecto CRELES. Los datos están dados en $\mu\text{g/g}$ de creatinina

Sustancia	Promedio	Desviación estándar	Rango reportado
<i>Epinefrina</i>	3.66	2.65	1.70 – 6.30
<i>Norepinefrina</i>	20.30	9.84	18.55 – 62.33
<i>Dopamina</i>	172.64	68.68	No reportado

5. DISCUSIÓN

La estandarización y validación de un método, requiere que se compruebe su utilidad, practicidad y valor estadístico.

El análisis y cuantificación de catecolaminas en orina utilizando la técnica de HPLC es un método ampliamente utilizado, sin embargo, la necesidad de asegurar la confiabilidad y repetibilidad del ensayo para las condiciones del laboratorio donde se realiza el análisis, así como la optimización para hacer el método más eficiente, llevó a la consecución de las pruebas que se han detallado en los apartados anteriores.

Las variaciones en los reportes de la literatura en cuanto al método de conservación de la muestra durante la colecta (Krstulovic 1982, Glies y Meggiorini 1983, Kaiichi y Ayako 1998, Panholzer *et al.* 1999, Ming-Cheng *et al.* 2000, Bioanalytical Systems 2001), plantearon la necesidad de evaluar condiciones de preservación con ácido, con refrigerante o con ambos. Krstulovic (1982) señala que la adición de ácido en la muestra tiene dos funciones primordiales, como lo son: evitar la contaminación y disminuir la descomposición de las catecolaminas (pues éstas son inestables en medio básico) y una disminución de la actividad enzimática y por lo tanto de la velocidad de oxidación de las catecolaminas.

Tal y como se presenta en la sección 4.2, en las pruebas realizadas no se encontraron diferencias en cuanto a la detección si se emplea ácido clorhídrico 6N o hielo gel como preservantes, e incluso si no se emplea ninguno de ellos. Tampoco se encontraron variaciones de concentración o estabilidad de las catecolaminas cuando las muestras fueron almacenadas a -20°C o a cuatro grados Celsius previo al análisis. Un resultado semejante obtuvieron Kaiichi y Ayako (1998) quienes demostraron que después de cuatro semanas en congelación (-20°C), las muestras preservadas a pH entre 0.5 y 7.0, aún se encontraban en condiciones óptimas para la medición, y no mostraban variaciones por estabilidad. También encontraron que muestras con un pH entre 3.0 y 7.0 no requieren refrigeración durante la colecta, y que pueden almacenarse a cuatro grados Celsius hasta por dos días antes de ser congelados. Se ha probado también, que muestras congeladas (-20°C ó -30°C) que no contenían ningún preservante durante su colecta pueden almacenarse durante algunos meses sin variaciones en la estabilidad o concentración de las sustancias (Glies y Meggiorini 1983, Boomsma *et al.* citados por Kaiichi y Ayako 1998).

A pesar de que estadísticamente no se encontraron variaciones en los tratamientos de preservación durante la colecta, la figura 12 muestra cómo la resolución de los cromatogramas y limpieza en la línea base se ve alterada al adicionar el ácido luego de que se ha colectado la muestra sin este preservante y sin refrigeración. Esta característica

sugiere la presencia de sustancias como resultado de algún proceso de degradación, y que magnifican su señal al modificar su estado electroquímico, esto como consecuencia del descenso del pH. Sin embargo, no se detecta un patrón de comportamiento en los demás cromatogramas que permita atribuir esa alteración en la limpieza de la línea base por la ausencia de alguno de los preservantes. Puesto que no hay diferencias en la concentración obtenida, puede seleccionarse alguno de los tratamientos de conservación evaluados para el procedimiento estandarizado, con excepción del tratamiento sin refrigeración y sin ácido durante la colecta y que se le adiciona ácido HCl 6N previo al almacenamiento y análisis de la muestra, pues esa condición afecta en la resolución de los cromatogramas logrados.

Con estos resultados y para las condiciones en las que se llevó a cabo la prueba (entre 20.0°C y 24.5 °C de temperatura ambiente), el procedimiento de colecta de muestras para la medición de catecolaminas en orina puede simplificarse y facilitarse, de forma que no requiera hieleras y refrigerantes para el mantenimiento de la temperatura u otros cuidados para la manipulación del ácido por parte de los voluntarios en el proyecto o por los técnicos del laboratorio. Esta condición resulta ventajosa si se considera que los muestreos (en el caso del proyecto CRELES) deben realizarse en todo el país, donde las facilidades de trabajo de campo se ven aún más limitadas.

A pesar de que la medición de catecolaminas en orina no presenta ningún requerimiento de preservación durante la colecta, el protocolo se estandarizó utilizando un refrigerante, esto porque la muestra de orina en el proyecto CRELES será empleada también para la medición de otras sustancias, entre ellas cortisol, que requiere que la muestra se mantenga por debajo de cinco grados Celsius para un análisis exitoso (Burtis 2001, DPC s.f.).

Dados los requerimientos y el protocolo empleado para la colecta en el proyecto CRELES, el refrigerante más conveniente es el hielo gel, pues, a pesar de que la temperatura de la muestra se mantiene mucho más baja al emplear hielo seco (ver figura 10) otros condicionantes como el transporte del material desde el proveedor hasta el centro de análisis, la disponibilidad de espacio y de congeladores especiales para el almacenamiento, la forma del material en el mercado (actualmente sólo se consiguen bloques de tres kilogramos y no en hojuelas como sería deseable), necesidad de uso de guantes criogénicos y el costo (resulta mucho más caro que el hielo gel), hacen que el hielo seco no resulte la mejor opción para el trabajo.

En lo concerniente a la selección de las marcas de hielo gel, las variables por considerar fueron el tiempo de entrega de las bolsas por parte del proveedor y el precio del material, esto porque las características de durabilidad y mantenimiento de la temperatura

requerida resultaron muy semejantes entre las marcas extranjeras y Ice Pack® (ver figura 11). Puesto que además el tiempo que tarda el material en descongelarse es suficiente para realizar todo el proceso de entrega, colecta y recolección de recipientes, se prefiere utilizar Ice Pack® como preservante.

Con el protocolo para la colecta estandarizado, se procedió a realizar evaluaciones y las consiguientes modificaciones del proceso de extracción en fase sólida que se realiza a la muestra de orina antes de su análisis por cromatografía. Las modificaciones fueron necesarias, pues los primeros resultados obtenidos siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial que distribuye el kit para la medición de catecolaminas, no fueron exitosos.

El uso de columnas pertenecientes al lote 3002604 fue la primera y quizá la más importante razón de estos resultados y por lo ende, de la obtención de una recuperación de 0% en casi todas las catecolaminas (sección 4.4). Se probó que las columnas enviadas no correspondían a las utilizadas para la medición de catecolaminas o presentaban algún defecto de fabricación, pues al evaluar columnas de otros dos lotes, en las mismas condiciones de análisis, mostraron porcentajes de recuperación considerablemente mayores (ver figura 13). El lote con la mejor recuperación fue el # 3002103, y fue por tanto el que se empleó para las pruebas siguientes.

A pesar de este cambio de las columnas, la recuperación obtenida no era la deseable, pues el valor mínimo para asegurar confiabilidad en el resultado es de un 70% para todas las catecolaminas. Un bajo porcentaje de recuperación (59.9% - 79.1%) obligaba a la corrección matemática de los valores de concentración calculados a partir de los cromatogramas, generando por tanto una mayor probabilidad de error en el dato generado.

Este problema se acrecentó en el caso de la epinefrina, catecolamina que se presenta fisiológicamente en menores concentraciones y que muestra por lo tanto un pico más pequeño en el cromatograma, lo que afecta a su vez la confiabilidad de la integración que se realiza posteriormente.

La situación se corrigió de dos maneras. En primera instancia, y por recomendación de la Doctora Baudrit*, se modificó la velocidad de elusión, que favoreció el porcentaje de recuperación de las catecolaminas, al pasar de valores entre 59.9% y 79.1%, a recuperaciones entre 85.8% y 96.9%. Esto demuestra que la velocidad de elusión es una variable crítica en los resultados obtenidos y que debe evaluarse siempre que se emplee el proceso de extracción en fase sólida para la limpieza de la muestra. Los valores obtenidos

* Baudrit, O. 2004. Extracción en fase sólida. (Comunicación personal) Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica.

se consideran exitosos, máxime si se compara con otros estudios en donde se han obtenido porcentajes de recuperación entre 49% y 54% (BAS 1983) o entre 82 y 95% (Panholzer 1999). Si bien el cambio en la velocidad de elusión provocó un aumento considerable en el tiempo del proceso de extracción, se considera un aporte importante al mejoramiento del proceso y que de igual manera se incorporará en el protocolo estandarizado propuesto.

Otro de los cambios adaptados para mejorar la detección y minimizar el error en la integración de los picos de las sustancias, fue el aumento en la concentración de la muestra inyectada, al reducir el volumen del reactivo D utilizado al final del proceso de extracción en fase sólida. La variación lograda en relación con la altura de los picos fue un resultado exitoso (ver figura 16), a pesar de que fue necesario sacrificar alrededor de un siete por ciento de recuperación de las muestras al disminuir la colecta hasta 0.5ml (figura 15).

Se sugiere que aproximadamente un 5.54% de la disminución en el porcentaje de recuperación de Dopamina se debe a que algunas moléculas de la sustancia se mantienen adheridas a la columna de separación después de que se ha eluido un mililitro del reactivo D (ver figura 17), no se encontraron pérdidas semejantes en epinefrina y norepinefrina que fuesen detectables por el aparato de medición.

Con los resultados obtenidos y la experiencia en las mediciones que se realizan diariamente, se encontró que resulta más confiable coleccionar 0.5ml del reactivo D al final del proceso de extracción en fase sólida, considerar luego el factor de dilución en la concentración medida de las catecolaminas y finalmente modificar el valor de la Dopamina según un factor de corrección de 5.54%.

La extracción en fase sólida puede realizarse a 20 muestras al mismo tiempo, sin embargo, eventualmente no todas esas muestras podrán analizarse en el HPLC el mismo día de la extracción. La necesidad de mantener refrigeradas las muestras que han sido pasadas previamente por un proceso de extracción en fase sólida y que no se pudieron analizar ese mismo día, llevó a la realización de la prueba cuyos resultados se presentan en la sección 4.7. Con estos resultados se puede concluir que las muestras acuosas o estándares acuosos, así como las muestras de orina que han sido previamente extraídas pueden utilizarse con confianza para la medición, incluso hasta cuando ha transcurrido una semana desde que se hicieron pasar por extracción en fase sólida y se han mantenido desde entonces en refrigeración (cuatro grados Celsius).

La definición del protocolo más adecuado para llevar a cabo el proceso de extracción en fase sólida, permitió la modificación y evaluación de otras variables que intervienen más directamente en el análisis de las muestras por HPLC. Es así como se desarrollaron las pruebas para definir el potencial y la intensidad de corriente a las que se debía realizar la

medición. La literatura señala (BAS 1983) que la detección de las catecolaminas puede llevarse a cabo en rangos del potencial eléctrico que van desde 550 mV hasta 800mV. Puesto que el manual del kit que se adquirió sugería la utilización de 600mV para la detección y debido a que no se encontraron diferencias significativas entre las respuestas, a diferentes potenciales (cuadro seis) se sugiere mantener la recomendación dada por Bioanalytical Systems (2001) en el manual del kit.

En relación con la intensidad de corriente, se encontró que en todos los casos en los que se empleaba 10nA durante la evaluación, el pico de la dopamina excedía el rango de detección, puesto que esta catecolamina es la que se encuentra siempre en mayores cantidades en las muestras de orina. Las pruebas realizadas para todas las catecolaminas se llevaron a cabo a 20nA, sin embargo, la práctica diaria demostró que la detección de los picos de epinefrina y norepinefrina resultaba más clara y la integración era más confiable, si estas sustancias se corrían a una intensidad de corriente de 10nA.

Puesto que en una misma corrida se obtienen los picos de las tres catecolaminas se realizó la corrida a 10nA hasta los 15 minutos, tiempo en el que se modificó la intensidad de la corriente a 20nA para asegurar que la altura del pico de la dopamina se encontrara dentro del rango de detección.

Tanto las muestras como los calibradores y los patrones se inyectaron también con una intensidad de corriente de 10nA los primeros 15 minutos y a 20nA en el resto de la corrida.

Una vez que se adaptaron éstas condiciones para el análisis, se inyectaron las primeras muestras y resultaron con ellas algunas interrogantes en cuanto al estándar de calibración empleado y el método de integración.

En relación con el estándar de calibración, este puede ser un estándar externo, es decir una inyección de una muestra con concentraciones conocidas de las sustancias por evaluar, o puede ser un estándar interno, en el que se emplea una sustancia control dentro de la inyección que tiene características químicas semejantes a las sustancias que se evalúan, y con base en el que se realiza el cálculo de la concentración de las muestras incógnitas.

Si bien el uso de un estándar interno está sumamente difundido y resulta de gran utilidad cuando se quiere disminuir el error en la medición (error causado por variaciones en la concentración de las sustancias durante la manipulación, almacenamiento o procesos previos a la medición como la extracción en fase sólida), en el caso del procedimiento para medición de catecolaminas en orina usando previamente una extracción en fase sólida, el

método de calibración más adecuado fue empleando un patrón con evaluación por estándar externo.

Esto se determinó debido a las constantes fluctuaciones observadas en la recuperación del estándar interno después de la extracción en fase sólida, fluctuaciones que repercutían considerablemente en los datos de concentración de las catecolaminas, además de que en todos los casos fue la sustancia que presentó un porcentaje de recuperación más bajo (figuras 13, 14 y 15) lo que hacía la medición menos confiable. Por esta razón se realizó el cambio en la utilización de un estándar interno por uno externo al realizar el cálculo correspondiente de las concentraciones de catecolaminas.

El patrón utilizado fue una curva lineal elaborada según como se describe en el apartado 3.2.3, con los calibradores acuosos dos, tres, cuatro y cinco.

Los resultados que se muestran en la sección 4.11 permiten asegurar que estas curvas de calibración pueden realizarse diariamente con calibradores que han sido elaborados hasta tres días antes de la medición, siempre que estos se hayan mantenido en refrigeración (cuatro grados Celsius) durante ese tiempo. Es posible que los calibradores puedan utilizarse con éxito por más de tres días, sin embargo no fue posible realizar esta prueba en el período de análisis correspondiente.

Otra de las pruebas realizadas, está relacionada también con la calibración y la integración, y es que, para llevar a cabo ésta última, y con ello determinar la concentración de las sustancias en la muestra inyectada, pueden utilizarse dos variables distintas: una de ellas utiliza la altura y la otra el área de los picos. Se evaluó cuál sería la variable más adecuada para la medición en este caso, pues, por una parte, en el laboratorio del Programa de Investigación en Neurociencias se utilizaba frecuentemente el área del pico, que resultaba más acorde con los análisis que se efectuaban y los cromatogramas que se obtenían (muestras de cerebro de ratas inyectadas para la medición de catecolaminas), pero por el otro, el manual de instrucciones del nuevo kit que se adquirió proponía la utilización de la altura como variable de integración.

Se realizaron mediciones para evaluar los posibles cambios en la cuantificación de las sustancias empleando uno u otro método (cuadro 10), sin embargo las variaciones en ese caso no fueron considerables, y por lo tanto no se encontraba, hasta entonces, una razón de peso para escoger la variable de integración.

Conforme se fueron realizando inyecciones consecutivas, se observó que los picos de la epinefrina y la norepinefrina comenzaban a unirse y se hacía difícil la separación de las áreas para la integración. Con ésta observación, se descartó el área y se incorporó la altura

de los picos como la variable por utilizar en el método estandarizado, pues la medición resultaba mucho más acertada y la integración estaba más sistematizada.

A pesar de que de alguna manera se redujo el error de integración al emplear la altura, la unión de los picos de las sustancias por analizar era un problema que se seguía presentando al inyectar muestras consecutivamente, lo que no resultaba adecuado para el análisis que se realizaba. Hasta ese momento, se tenía que la combinación de variables para tener un protocolo más efectivo y hacer un tiempo de corrida menor, era 1,5ml/min con una temperatura de 40°C. Sin embargo, la experiencia demostró, que la cercanía entre los picos de epinefrina y norepinefrina se aumentaba después de algunas horas de inyecciones consecutivas, tanto, que el patrón de calibración consideraba los picos de la norepinefrina como si fueran de epinefrina, condición que invalidaba el cálculo de la concentración que se llevaba a cabo por el software, y que demostraba que en la práctica, la temperatura y el flujo resultaban condicionantes para el éxito de la medición.

Se probó entonces la modificación en estas variables que influían en los tiempos de retención de las sustancias y por tanto en la separación de los picos. Se varió el flujo y la temperatura de la columna de separación (cuadro 7), y se encontraron amplias diferencias en los tiempos totales de la corrida y en la separación de los picos (figura 18), pero no en la concentración de las sustancias por analizar

La primera variable que se modificó fue la temperatura de la columna de separación. Los resultados obtenidos demostraban que a una menor temperatura (temperatura ambiente) se lograba una mejor separación en los picos de epinefrina y norepinefrina (figura 18), pero la necesidad de controlar y sistematizar las condiciones del análisis y de disminuir el tiempo en la corrida tanto como fuera posible, no eran factibles si no se utilizaba el calentador de la columna. El aparato utilizado funcionó como un calentador, pero sobre todo como controlador de la temperatura interna, que aseguraba reproducibilidad en el método y que los tiempos de retención se mantuvieran constantes.

Con esas condiciones, lo que resultaba más recomendable era utilizar la mínima temperatura que pudiera regularse con el controlador, de forma que la separación fuera exitosa, y el método estuviera normalizado. Al revisar el manual, se encontró que la efectividad del aparato está condicionada a que la temperatura de control seleccionada esté dos grados Celsius por encima de la temperatura ambiente. Con un registro tomado durante un mes, se encontró que la temperatura del laboratorio oscilaba entre 18°C y 25°C, lo que permitía seleccionar una temperatura de 27 °C para el análisis. A pesar de esto, la temperatura seleccionada fue de 28 °C (es decir un grado más que el aceptable para las condiciones dadas) para evitar que pequeñas variaciones en la temperatura del ambiente,

afectaran eventualmente la reproducibilidad del análisis. La mínima temperatura posible de controlar y que presenta tiempos de corrida aceptables para lograr un análisis más agilizado de varias muestras en un día de análisis en el laboratorio, fue por tanto, 28 °C.

A esa temperatura, se evaluaron las posibles variaciones causadas por cambios en el flujo, pero no se encontraron diferencias significativas al inyectar muestras a un mililitro por minuto o 1.5ml/min. Puesto que con este último flujo los tiempos de corrida se disminuyeron, fue el que se seleccionó y continuó aplicando para los análisis siguientes.

El patrón de comportamiento señala, que los aumentos de la temperatura así como del flujo de inyección, provocan tiempos de retención más cortos y que los picos de las sustancias tienden a estrecharse. Esto se debe, por una parte a que la velocidad de arrastre se aumenta, y por lo tanto disminuye el tiempo en el que se observarán los picos; y por el otro, que se aumenta la movilidad de las moléculas y de los electrones, haciendo que la corrida se realice con mayor rapidez.

No fue posible modificar la composición de la fase móvil para variar el factor de capacidad y con este necesariamente el tiempo de retención de las sustancias (Isimer *et al.* 1991), pues la casa comercial que distribuye el kit se reserva la composición química de este compuesto, de manera que resulta inmodificable por el usuario. La única recomendación que al respecto de la fase móvil se hace en el manual del kit, es que ésta no debe recircularse durante el análisis. A pesar de esa recomendación, y a razón de minimizar los costos, se probó reutilizar la fase móvil en tantas inyecciones de muestras como fuese posible.

Se encontró que no hay cambios en la limpieza y resolución de los cromatogramas o amplias modificaciones químicas de la fase móvil al recircular ésta última durante la inyección de las primeras muestras. Pero, conforme se realizan inyecciones consecutivamente, la fase móvil se contamina, y se modifican las propiedades químicas de utilidad en la técnica de cromatografía líquida para detección de catecolaminas.

También se encontró que el volumen del líquido enviado desde la casa comercial, no es suficiente para evaluar las muestras que se indican por cada kit (100 muestras), por lo que no es posible desechar todo el material que está circulando tal y como ellos mismos lo recomiendan. Por las razones discutidas, reciclar la fase móvil es una práctica que necesariamente debe realizarse pero con algunos cuidados. No fue posible realizar ensayos al respecto, pero en la experiencia diaria resultó exitoso sólo recircular la fase móvil durante la inyección de alrededor de 20 muestras por cada litro. Para la inyección de las muestras subsiguientes, se ha visto que es más adecuado desechar el líquido para evitar contaminaciones en la fase móvil y los cromatogramas, y también la formación de picos deformados de las sustancias por analizar.

Una vez que se establecieron las condiciones para la colecta y el análisis de las muestras en el laboratorio, se validó al método propuesto, al comprobar estadísticamente que este es repetible y exacto para las tres catecolaminas que se lograron analizar (secciones 4.13 y 4.14). También se comprobó que el método es lineal en rangos amplios, entre los que se encuentran las concentraciones esperadas de las catecolaminas en orina de las personas por evaluar.

Con el método validado, se procedió a realizar una prueba piloto y a comparar los resultados obtenidos con otros estudios, de manera que se determinara así la precisión del método propuesto.

A pesar de que los valores de concentración de las sustancias obtenidos en las pruebas iniciales para la estandarización de este protocolo, fueron reportados en su totalidad en nanogramos de sustancia por cada mililitro de orina, en el reporte de la concentración en muestras de la prueba piloto, los resultados se expresaron en microgramos de sustancia por cada gramo de creatinina. Esta conversión en las unidades permite ofrecer un dato corregido según la talla del individuo y el volumen urinario excretado, es decir, un dato más preciso, comparable con otros datos de individuos evaluados de la misma manera. La creatinina se sintetiza en el hígado y el páncreas y se utiliza generalmente para evaluar función renal y filtración glomerular. Puesto que la excreción de creatinina permanece relativamente constante para cada sujeto, mientras que el volumen de excreción urinario puede variar apreciablemente, se utiliza el nivel de creatinina en la orina diaria como índice al que referir los valores de otros metabolitos, en este caso las catecolaminas.

Los resultados de la prueba piloto son satisfactorios, y demuestran que el protocolo seleccionado y mejorado es preciso, pues los valores encontrados se encuentran dentro de los rangos que reporta la literatura (cuadro 14).

Se probó entonces la utilidad de este método para la cuantificación de epinefrina y norepinefrina en orina de adultos mayores, de interés inmediato para la determinación de la carga alostática en el proyecto CRELES. En este contexto, la concentración de éstas catecolaminas refleja la condición del Sistema Nervioso Simpático, el funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y una posible asociación con estrés crónico en las personas (Chrousos y Gold 1998, Ziegler *et al.* 1999, Mayer 2000, Zuckerman-Levin *et al.* 2001, Dean *et al.* 2002) y particularmente en adultos mayores (Chrousos 1995, Ester *et al.* 1995, McEwen 2000, Esler *et al.* 2002, Seeman *et al.* 2004). La técnica podría utilizarse también para otros análisis en los que se han empleado las catecolaminas urinarias como indicadores, tal es el caso de diagnósticos clínicos de feocromocitomas y la valoración de tratamientos de esquizofrenia juvenil (Volmer *et al.* s.f), entre otros.

Además de los objetivos planteados inicialmente, durante las pruebas realizadas se logró validar también el método para el análisis y cuantificación de la concentración de dopamina en orina, valor que podría utilizarse eventualmente como elemento de apoyo en el estudio de otros padecimientos, como la enfermedad de Parkinson o déficit atencional (Bailador y Dajas 2000).

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con las pruebas realizadas y las condiciones en las que éstas se llevaron a cabo, se concluye:

1. Para la medición de catecolaminas, no es indispensable emplear algún preservante en la muestra de orina durante el periodo de colecta.
2. Hubo amplias variaciones en relación con el porcentaje de recuperación obtenido, según el lote de columnas de extracción utilizado.
3. La velocidad de elusión durante el procedimiento de extracción en fase sólida es una variable crítica, pues con ella también varía considerablemente el porcentaje de recuperación de catecolaminas.
4. El mayor porcentaje de recuperación obtenido después de la extracción en fase sólida se logró al emplear una velocidad de elusión de 0.1 ml/min aproximadamente.
5. La detección de las catecolaminas en los cromatogramas y la integración que se realiza, resulta más confiable si se emplea 0.5ml de reactivo D al final del proceso de extracción en fase sólida.
6. El potencial eléctrico óptimo para el análisis de catecolaminas en orina es de 600mV.
7. Se encontró que la intensidad de corriente más adecuada para el análisis es de 10nA para epinefrina y norepinefrina y de 20nA para dopamina.
8. No hay diferencias significativas en la detección de las sustancias si se varía la temperatura de la columna de separación o el flujo durante la corrida en el cromatógrafo, aunque para un análisis más eficiente, se prefiere inyectar las muestras en el cromatógrafo a un flujo de 1,5ml/min y cuando la temperatura de la columna de separación se mantiene a 28 °C.

9. Debido a que el estándar interno presenta un comportamiento más inestable que el resto de las sustancias, resulta más confiable utilizar un estándar externo como calibrador.
10. Durante el proceso de integración de los cromatogramas, es más regular y preciso utilizar la altura de los picos como parámetro de medición y cuantificación.
11. Las muestras almacenadas a cuatro grados Celsius y que han sido pasadas previamente por el proceso de extracción en fase sólida, son estables y pueden ser medidas hasta una semana después de que han sido extraídas, sin que ocurra una variación significativa en la concentración de las catecolaminas por evaluar.
12. El método propuesto para la medición de catecolaminas en orina es repetible, exacto y presenta linealidad en rangos que van desde 4.7ng/ml y 75ng/ml en epinefrina, 7.0 ng/ml y 112.5 ng/ml en norepinefrina, y de 46.9ng/ml y 750ng/ml en dopamina.
13. De los resultados obtenidos en la prueba piloto, se concluye que el método propuesto es preciso, y puede utilizarse con confianza en la medición de catecolaminas en orina de adultos mayores.
14. Este método podría implementarse en el estudio de otros muchos padecimientos como el Parkinson y el déficit atencional, entre otros.

7. RECOMENDACIONES

1. Puesto que se comprobó una pérdida en el porcentaje de recuperación de dopamina, causado por la disminución del volumen de eluente D colectado, se recomienda corregir los valores de dopamina obtenidos en los cromatogramas utilizando un factor de 5.54%, o en su defecto realizar otras pruebas para obtener un factor de corrección estadísticamente válido.
2. Dado que por razones de costos y de aprovechamiento de los recursos se requiere recircular la fase móvil, se recomienda hacerlo solamente durante la inyección de 20 muestras por cada litro de fase móvil como máximo.
3. Para asegurar el eficiente funcionamiento del controlador de temperatura, mantener las condiciones de análisis y disminuir la cantidad de recursos y electricidad que se consume, se recomienda encender el aire acondicionado del laboratorio solamente cuando la temperatura del ambiente supere los 25 °C.
4. Para efectos de tener un mejor control sobre las variables relacionadas con el HPLC, se recomienda elaborar una nueva fase móvil, de forma que el conocimiento de la composición de la misma permita su evaluación y mejora en condiciones en las que la técnica y el análisis así lo demanden. Esto no sucede con la fase móvil del kit, en la que, a falta de conocer su composición, no se puede hacer en ese sentido ninguna modificación que aporte al mejoramiento de la técnica.
5. Las pruebas realizadas tenían como objetivo inicial demostrar y probar su utilidad en la medición de catecolaminas en orina de adultos mayores, sin embargo, es posible que este mismo método pueda emplearse para adultos, jóvenes e incluso niños, por lo que se recomienda realizar las pruebas pertinentes, y así ampliar el rango en la utilidad de este protocolo.
6. Con el objetivo de disminuir los costos del análisis, y de aprovechar mejor los recursos disponibles, se recomienda evaluar la posible reutilización de los cartuchos empleados en el proceso de extracción en fase sólida.

REFERENCIAS

- Adam Quality. 2001. MedlinePlus: Catecolaminas en orina-información general (en línea). Consultado 21 may. 2004. Disponible en: <http://pcs.adam.com/ency/article/003613.htm>
- Bailador, P. & Dajas, F. 2000. Test paraclínicos para el diagnóstico del déficit atencional. Revista de Psiquiatría del Uruguay. 64(2): 245-254.
- BAS. 1983. Bionalytical Systems Inc: Liquid Chromatograph, User's manual. United States of America.
- Bioanalytical Systems. 2001. Urinary Catecholamines kit: Instruction Manual. Bioanalytical Systems. USA.
- Bioanalytical Systems. 2001. Análisis de catecolaminas (en línea) Consultado en Junio del 2004. Disponible en: www.bastox.com.
- Biopsicología. 2004. Noradrenalina (en línea). Consultado 21 may. 2004. Disponible en: <http://www.biop.biz/fichas/fic-168-3.html>
- Bonet, J. 2004. El estrés como factor de vulnerabilidad: de la molécula al síndrome. Simposio Gador. Congreso Argentino de Psiquiatría APSA. Argentina.
- Burtis, C. 2001. Tietz: Fundamentals of Clinical Chemistry. Fifth edition.
- Carlson, N. 1993. Fisiología de la conducta. Ariel Psicología. Barcelona, España.
- Chrousos, G. 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. The New England Journal of Medicine. 332 (20): 1351-1362.
- Chrousos, G. & Gold, P. 1998. Editorial: A healthy body in a healthy mind- and *vice versa*- the damaging power of "uncontrollable" stress. Journal of clinical endocrinology and metabolism. 83 (6): 1842-1845.
- Crimmins, E.; Jonhston, M.; Hayward, M. & Seeman, T. 2003. Age differences in allostatic load: an index of physiological dysregulation. Experimental Gerontology. 38: 731-734.
- Dean, R.; Chummun, H. & Prashad, D. Differences in urinary stress hormones in male and female nurses at different ages. 2002. Journal of Advance Noursing. 37 (3): 304-310.
- DPC. s.f. Coat-A-Count "Cortisol". Panfleto del kit para análisis por la técnica de RIA.
- Esler, M.; Kaye, D.; Thompson, J.; Jennings, G.; Cox, H.; Turner, A.; Lambert, G. & Seals, D. 1995. Effects of Aging on epinephrine secretion and regional release of epinephrine from the human heart. Journal of clinical endocrinology and metabolism. 80 (2): 435-442.
- Esler, M.; Hastings, J.; Lambert, G.; Kaye, D.; Jennings, G. & Seals, D. 2002. The influence of aging on the human sympathetic nervous system and brain norepinephrine turnover. American journal Physiological Regulatory Integrative components of physiology. 228: R909-R916.
- Fornaguera, J. & Gómez, G. 2004. Bioquímica la ciencia de la vida. EUNED. San José. Costa Rica. 340p

- Glaxo Smithkline. 2004. Estrés (en línea). Consultado 17 jun. 2004. Disponible en: <http://www.tuotromedico.com/temas/estres.htm>
- Glies, H. & Meggiorini, S. 1983. Stability of catecholamine in urine. *Clinical Chemistry*. 29: 595-600
- Gómez, V. 2000. Relación entre estrés e inmunidad: una visión crítica de la investigación. *Revista Latinoamericana de Psicología*. 32 (1): 31-45.
- Gómez, B. & Escobar, A. Neuroanatomía del estrés. *Revista Mexicana de neurociencias*. 3(5): 273-282.
- Greger, R & Windhorst L. (Eds). 1996. *Comprehensive human physiology*. Vol 1: From cellular mechanism to integration. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- IBL online catalogue. 2004. Kat Combi RIA (en línea). Consultado 24 mar. 2004. Disponible en: <http://www.ibl-hamburg.com>
- INEC: Instituto Nacional de estadísticas y Censos. 2001. IX Censo Nacional de población y V de vivienda del 2000: Resultados generales. San José, Costa Rica.
- Isimer, A.; Basci, N.; Bozkurt, A. & Kayaalp, S. Effects of mobile phase composition on the separation of catecholamines by liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Islamic Academy of Sciences*. 4(2): 130-135
- Kaiichi, M. & Ayako, S. 1998. Effect of urine pH, storage time and temperature on stability of catecholamines, cortisol and creatinine. *Clinical Chemistry*. 44(8): 1759-1762
- Kandel, E.; Schwartz, J. & Jessell, T. 1991. *Principles of neural science*. Elsevier Science Publishing Co. Third edition. United States of America.
- Krstulovic, A. 1982. Review. Investigations of catecholamine metabolism using High Performance Liquid Chromatography, Analytical Methodology and Clinical Applications. *Journal of Chromatography Biomedical Applications*. 229(1): 1-34
- Macherey-Nagel. 2000. *Chromatography*. Catálogo de ventas. Segunda edición. United Kingdom
- Martini, F. 1998. *Fundamentals of Anatomy and Physiology*. Prentice Hall. Cuarta Edición. United States of America.
- Matey, P. 1999. Neurología: el estrés crónico causa daños en el cerebro (en línea). Consultado 17 jun. 2004. Disponible en: <http://www.el-mundo.es/salud/1999/340/02537.html>
- Mathews, C. & van Holde, K. 1999. *Bioquímica*. Mc Graw Hill. Segunda edición. España.
- Mathews, C.; van Holde, K. & Ahern, K. 2002. *Bioquímica*. Addison Wesley. Tercera edición. España.
- Mayer, E. 2000. Review: The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut*. 47: 861-869.
- McEwen, B. 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*. 886: 172-189.

- McEwen, B.S & Stellar, E. 1993. Stress and the individual mechanisms leading to disease. *Archives of Internal Medicine*. 153. 2093-2101
- McEwen, B.S. 1998. Protective and damaging effects of stress. *New England Journal of Medicine*. 338 (3) 171-179
- McEwen, B. & Seeman, T. 1999. Allostatic Load and Allostasis. *Research Network on Socioeconomic Status and Health*.
- Mckee, T. & Mckee, J. 2003. *Bioquímica: la base molecular de la vida*. McGraw-Hill Interamericana. Tercera Edición. España.
- Ming-Cheng, C.; Hui-Sheng, L.; Yi-Li, C.; Yu-Husan, L.; Shu-Hui, L.; I-Wen, L. & Hsia-Yuan, L. 2000. *Social Environment and Biomarkers of Aging Study in Taiwan (SEBAS)*. Office of Population Research Princeton University- Center for Population Health Georgetown University. Taiwan.
- Nelson, D. y Cox, M. 2000. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. Third edition. United States of America.
- Nieuwenhuys, R. 1985. *Chemoarchitecture of the brain*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Panholzer, T.; Beyer, J. & Lichtwald, K. 1999. Coupled-Column Liquid Chromatographic Analysis of catecholamines, serotonin, and metabolites in human urine. *Clinical Chemistry*. 45 (2): 262-268
- Proyecto Estado de la Nación. 2003. *Estado de la Nación 2002*. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Costa Rica.
- Purves, D.; Augustine, G.; Fitzpatrick, D.; Katz, L.; LaMantia, A.S. y McNamara, J. 2001. *Invitación a la neurociencia*. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Roskoski, R. 1997. *Bioquímica*. McGraw Hill-Interamericana. México. 560p
- Sadek, N. & Nemeroff, C. 2000. Update on the Neurobiology of Depression (en línea). Consultado 6 Nov 2004. Disponible en: <http://www.medscape.com/viewprogram/142>.
- Seeman, T.; McEwen, B.; Rowe, J. & Singer, B. 2001. Allostatic load as a marker of cumulative biological risk: McArthur Studies of successful aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (8) 4770-4775.
- Seeman, T.; Crimmings, E.; Huang, M.; Singer, B.; Bucur, A.; Gruenewald, T.; Berkman, L. & Reuben, D. 2004. Cumulative biological risk and socioeconomic differences in mortality: McArthur Studies of successful aging. *Social Science & Medicine*. 58 1985-1997.
- Siegel, G.; Agranoff, B.; Albers, R.W. & Molinoff, P. 1994. *Basic Neurochemistry*. Raven press. Fifth Edition. New York. U.S.A.
- Skoog, D. & Learly, J. 1994. *Análisis Instrumental*. McGraw-Hill. Cuarta edición. España.
- Thermo Electron Corporation. 2004-2005. *Columns and accesorios for LC and LC/MS (Chromatography)*. Catálogo de ventas. United States of America.

- Thermo Hypersil-Keystone. 2002. Column Technologies for HPLC and LC/MS. Catálogo de ventas. United States of America.
- Volmer, C.; Ure, J.; D'Ámore, B.; Argüelles, A. & Videla, H. s.f. Valores de cortisol plasmático y de catecolaminas y 17-cetosteroides urinarios en esquizofrénicos juveniles en tratamiento. ALCMEON: Revista Argentina de Clínica Neuropsiquiátrica. No 9.
- Waters. 1991. Waters 464 Pulsed Electrochemical detector: Operator's manual. Millipore Corporation. U.S.A.
- Ziegler, D.; Cass, W. & Herman, J. 1999. Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis response to stress. Journal of neuroendocrinology. 11: 361-369.
- Zigmond, M.; Bloom, F.; Landis, S.; Roberts, J. & Squire, L. 1999. Fundamental Neuroscience. Academic Press. United States of America.
- Zuckerman-Levin, N.; Tiosano, D.; Eisenhofer, G.; Bornstein, S. & Hochberg, Z. 2001. The importance of adrenocortical glucocorticoids for adrenomedullary and physiological response to stress: A study in isolated glucocorticoid deficiency. The Journal of clinical endocrinology & Metabolism. 86 (12): 5920-5924.

ANEXOS