

## Valoración espectrofluorométrica de 5-hidroxitriptamina y 5-hidroxiindolacético en diencefalo de rata

E. Martínez-Conde, M. J. López-Puente, M. L. Leret y A. Fraile

Departamento de Fisiología Animal  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid

(Recibido el 31 de marzo de 1981)

E. MARTINEZ-CONDE, M. J. LOPEZ-PUENTE, M. L. LERET and A. FRAILE. *Spectrofluorometric Determination of 5-Hydroxytryptamine and 5-Hydroxyindoleacetic Acid in Rat Diencephalon*. Rev. esp. Fisiol., 38, 41-46. 1982.

A spectrofluorometric method to determine 5-HT and 5-HIAA in rat diencephalon has been developed, following the criterion of unifying the methodology in determining biogenic amines and their metabolites.

Linearity in the method remains in the interval between 0.01  $\mu\text{g}$  and 0.05  $\mu\text{g}$ . Recovery is about 70 % for amine and about 80 % for the metabolite

Highest concentrations of 5-HT appear in one month old female animals, and are significantly higher than those found in the male population of the same age.

Concentrations in two month old animals decrease, without significant differences between males and females.

Values found for 5-HIAA seem not to change so significantly, although a slight decrease is observed in the elder males.

Durante la última década el estudio de las aminas biógenas y de algunos de sus metabolitos en cerebro de mamífero ha dado lugar a numerosas investigaciones. Las diferencias en la metodología aplicada, así como las múltiples implicaciones que condicionan sus tasas, hacen que la disparidad de resultados sea tan manifiesta. El desarrollo de técnicas sensibles, como las espectrofluorométricas, cobra un especial interés.

La importancia fisiológica de la 5-HT ha derivado del papel que le ha sido asignado en varios sistemas de regulación bio-

lógica, tales como: mecanismos de vigilia y sueño, control de la temperatura, regulación motriz a nivel extrapiramidal, alteraciones en el comportamiento animal, etc. Pero estudios recientes apuntan hacia el papel que juega la serotonina cerebral como factor neuroendocrino del comportamiento reproductor.

Incrementos en los niveles de serotonina se han asociado con el comportamiento de celo, la ovulación y el retraso en el comienzo de la pubertad (6). Para INGEBORD *et al.* (8) el comportamiento sexual parece estar bajo el control inhibi-

torio de un sistema cerebral serotoninérgico. Se ha observado que los tratamientos farmacológicos que rebajan las tasas de serotonina, tales como: paraclorofenilalanina (PCPA), reserpina, metisérgicos y otros, estimulan el comportamiento sexual, en tanto que incrementos en cerebro de dicha indolamina tienden a inhibirlo.

Los estudios comenzaron por una presunta diferencia en el contenido de serotonina entre cerebros de machos y de hembras (9). Otros autores no encontraron diferencias manifiestas. LADOSKY y GAZIRI (13) demostraron estudiando cerebros de machos y hembras de rata, de edades entre dos y doce días que, mientras las cantidades de serotonina son semejantes en los dos sexos hasta el octavo día, alcanzan una subida en las hembras en el duodécimo día, aunque esta diferencia no se manifiesta en hembras a las que se ha inyectado testosterona al nacer. Esto hizo pensar que la concentración de 5-HT puede relacionarse con los procesos de diferenciación sexual del cerebro.

En nuestro trabajo se estudian los niveles de 5-HT, así como los de su metabolito principal 5-HIAA, en el diencéfalo de rata, pretendiendo cuantificarlos para tratar de interpretar si los factores relacionados con el sexo intervienen, a edades entre uno y dos meses, en la pauta degradativa de la serotonina.

### Material y métodos

Se han utilizado ratas Wistar, machos y hembras, de uno y dos meses de edad. Han sido seleccionadas por camadas y separadas por sexos. Una vez decapitados los animales, se procedió al aislamiento del cerebro, conservándolo durante un máximo de un mes a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El sacrificio se efectuó siempre a la misma hora para evitar sesgos debidos

al ritmo circadiano (8-9 de la mañana). El aislamiento del diencéfalo se llevó a cabo según GLOWINSKI e IVERSEN (4).

El proceso de extracción fue esencialmente el de MAICKEL *et al.* (14). La valoración espectrofluorométrica corresponde a un micrométodo de CURZON y GREEN (2), con ligeras modificaciones.

Se homogeneizó con butanol acidificado, seguido de centrifugación. Las adiciones sucesivas de n-heptano y ClH-L cisteína permitieron separar dos fases: una acuosa en la que se investigó 5-HT y otra orgánica en la que se determinó 5-HIAA.

La valoración se llevó a cabo en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer; el desarrollo del fluorocromo tiene lugar por la copulación del oftaldehído (OPT) en medio fuertemente ácido, seguida de calentamiento. La presencia de cisteína incrementa cuatro veces la fluorescencia de la 5-HT, cumpliendo también la misma función para el 5-HIAA.

Las soluciones estándar se prepararon disolviendo en agua desionizada 5-hidroxitriptamina-sulfato de creatina a  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , para la serotonina, que fue conservada a  $-25^{\circ}\text{C}$  y en su día en ClH-cisteína (1:100) para su uso; las correspondientes al 5-HIAA fueron preparadas al  $15\ \mu\text{g}/\text{ml}$  y, también conservadas a  $-25^{\circ}\text{C}$  y diluidas (1:100) en solución tampón de fosfatos (pH 7).

Las longitudes de onda para excitación y fluorescencia fueron, respectivamente,  $360\ \text{m}\mu$  y  $470\ \text{m}\mu$  (x. 10; Sc. 3) en ambos casos (5-HT y 5-HIAA). Las interferencias que podrían haberse producido fueron nulas para las concentraciones halladas en cerebro. La destrucción de 5-HT, que hubiera podido pasar a la fase orgánica, se llevó a cabo con periodo.

Se investigaron las tasas de recuperación, obteniéndose los factores correctores 1,33 para la 5-HT y 1,18 para el 5-HIAA.

Tabla I. *Concentración y cantidad total de 5-hidroxitriptamina en diencéfalo de rata.* Todos los datos están expresados como media  $\pm$  error estándar. Entre paréntesis, número de animales analizados por grupo.

Sexo	Edad (meses)	Camada		Concentración ( $\mu\text{g/g}$ )	Cantidad total ( $\mu\text{g}$ )
<i>Distribuciones por camadas</i>					
Hembras	1	1	(6)	1,506 $\pm$ 0,08	2,017 $\pm$ 0,10
		2	(4)	1,353 $\pm$ 0,14	1,799 $\pm$ 0,18
		3	(4)	1,472 $\pm$ 0,37	1,957 $\pm$ 0,50
		4	(3)	1,591 $\pm$ 0,29	2,116 $\pm$ 0,31
Machos	1	1	(5)	1,088 $\pm$ 0,15	1,434 $\pm$ 0,19
Hembras	2	1	(6)	0,898 $\pm$ 0,05	1,175 $\pm$ 0,05
		2	(7)	0,913 $\pm$ 0,15	1,214 $\pm$ 0,20
Machos	2	1	(5)	0,836 $\pm$ 0,10	1,112 $\pm$ 0,14
		2	(6)	0,938 $\pm$ 0,23	1,247 $\pm$ 0,31
		3	(3)	0,972 $\pm$ 0,12	1,293 $\pm$ 0,16
<i>Distribuciones marginales</i>					
Hembras	1		(17)	1,477 $\pm$ 0,25	1,964 $\pm$ 0,33
Machos	1		(5)	1,088 $\pm$ 0,25	1,434 $\pm$ 0,19
Hembras	2		(13)	0,906 $\pm$ 0,12	1,197 $\pm$ 0,16
Machos	2		(14)	0,909 $\pm$ 0,18	1,209 $\pm$ 0,24
Hembras			(30)	1,230 $\pm$ 0,35	1,647 $\pm$ 0,46
Machos			(19)	0,956 $\pm$ 0,19	1,268 $\pm$ 0,25
M + H	1		(22)	1,389 $\pm$ 0,28	1,844 $\pm$ 0,37
M + H	2		(27)	0,907 $\pm$ 0,15	1,204 $\pm$ 0,21

Tabla II. *Concentración y cantidad total de 5-hidroxiindolacético en diencéfalo de rata.* Todos los datos están expresados como media  $\pm$  error estándar. Entre paréntesis, número de animales analizados por grupo.

Sexo	Edad (meses)	Camada		Concentración ( $\mu\text{g/g}$ )	Cantidad total ( $\mu\text{g}$ )
<i>Distribuciones por camadas</i>					
Hembras	1	1	(5)	0,378 $\pm$ 0,06	0,447 $\pm$ 0,07
		2	(2)	0,359 $\pm$ 0,03	0,424 $\pm$ 0,03
		3	(3)	0,401 $\pm$ 0,05	0,473 $\pm$ 0,05
		4	(3)	0,541 $\pm$ 0,06	0,639 $\pm$ 0,07
Machos	2	1	(5)	0,462 $\pm$ 0,06	0,546 $\pm$ 0,07
Hembras	2	1	(3)	0,417 $\pm$ 0,01	0,493 $\pm$ 0,01
		2	(5)	0,504 $\pm$ 0,17	0,596 $\pm$ 0,18
Machos	2	1	(3)	0,338 $\pm$ 0,08	0,394 $\pm$ 0,09
		2	(3)	0,349 $\pm$ 0,09	0,413 $\pm$ 0,11
		3	(2)	0,302 $\pm$ 0,07	0,356 $\pm$ 0,08
<i>Distribuciones marginales</i>					
Hembras	1		(13)	0,418 $\pm$ 0,09	0,494 $\pm$ 0,10
Machos	1		(5)	0,462 $\pm$ 0,06	0,546 $\pm$ 0,07
Hembras	2		(8)	0,472 $\pm$ 0,13	0,558 $\pm$ 0,15
Machos	2		(8)	0,332 $\pm$ 0,08	0,404 $\pm$ 0,11
Hembras			(21)	0,439 $\pm$ 0,11	0,518 $\pm$ 0,13
Machos			(13)	0,382 $\pm$ 0,10	0,451 $\pm$ 0,12
M + H	1		(18)	0,430 $\pm$ 0,08	0,508 $\pm$ 0,10
M + H	2		(16)	0,404 $\pm$ 0,13	0,474 $\pm$ 0,15

### Resultados

La relación entre la intensidad de la fluorescencia y las concentraciones de 5-hidroxitriptamina es lineal en el intervalo 0,01-0,05  $\mu\text{g}$ . La adición de cisteína asegura la constancia de la relación.

La tabla I muestra los datos de la 5-hidroxitriptamina expresados en  $\mu\text{g/g}$  de tejido fresco, y se calcula el total teórico previa investigación de las tasas de recuperación. Se expresan separadamente los datos obtenidos en cada camada y se indica el número de animales que la integran. En la parte inferior de la tabla se integran los datos correspondientes a machos y hembras de uno y dos meses, a totales de machos y de hembras y a totales de animales de uno y dos meses sin aceptación de sexo.

La tabla II muestra los datos correspondientes al 5-hidroxiindolacético; está construida con los mismos criterios que la tabla I.

### Discusión

El método usado ofrece garantías de reproducibilidad, lo que permite detectar las variaciones en la concentración de ambos compuestos cuando los animales sean sometidos a condiciones que interese estudiar.

Las interferencias que pudieron haberse producido entre 5-hidroxitriptamina y 5-hidroxiindolacético fueron nulas para las concentraciones halladas en el diencefalo.

La recuperación fue del 70 % para la 5-hidroxitriptamina y del 80 % para el 5-hidroxiindolacético.

En cuanto a la 5-hidroxitriptamina, es claramente significativa la diferencia encontrada entre las concentraciones en hembras de uno y dos meses, y en machos y hembras de un mes de edad. Pero no son significativas las diferencias entre machos de uno y dos meses, y entre machos y hembras de dos meses.

Las concentraciones del 5-hidroxiindolacético no presentaron diferencias significativas entre los distintos grupos estudiados, excepto un ligero descenso que se observa en los machos entre uno y dos meses.

Los trabajos de LADOSKY y GAZIRI (13) ponen de manifiesto un incremento de la 5-hidroxitriptamina con la edad, así como una mayor concentración en ratas hembras. Al duodécimo día las hembras muestran valores significativamente más altos que los de los machos. Estos datos concuerdan con el incremento en los niveles de serotonina en hembras, alrededor del décimo día, referido por otros autores (5). No se han encontrado datos en la bibliografía a partir de los doce días. Aquí, se ha determinado la 5-hidroxitriptamina a edades de uno y dos meses, encontrándose un valor máximo al mes y un descenso significativo a los dos meses, sobre todo en ratas hembras. El hecho notable de un descenso para ambos sexos a los dos meses, podría quizá suscitar la hipótesis de una estabilización de la amina con el tiempo, y con la completa diferenciación sexual de las estructuras hipotalámicas (13). En cierta medida esta hipótesis podría estar apoyada por la uniformidad en la pauta degradativa del 5-hidroxiindolacético hacia los dos meses de edad.

### Resumen

Se ha puesto a punto un método espectrofluorométrico para determinar 5-HT y 5-HIAA en diencefalo de rata, siguiendo el criterio de unificar la metodología en la determinación de las aminas biógenas y de sus metabolitos.

La linealidad del método se mantiene en el intervalo 0,01-0,05  $\mu\text{g}$ . La recuperación es del orden del 70 % para la amina y del orden del 80 % para su metabolito.

Las mayores concentraciones de 5-HT aparecen en animales hembras de un mes, y son significativamente mayores que en machos de la misma edad.

Las concentraciones en animales de dos me-

ses son menores, no manifestándose diferencias significativas entre machos y hembras.

Los valores hallados para 5-HIAA no parecen variar significativamente, pero se observa en los machos un cierto descenso con la edad.

### Bibliografía

1. CORBIN, A. y SCHOTELIUS, B. A.: *Amer. J. Physiol.*, 201, 1176-1180, 1961.
2. CURZON, G. y GREEN, A. R.: *Brit. J. Pharmacol.*, 39, 653-655, 1970.
3. CHILCOTE, D. D. y MROCHEK, J. E.: *Clin. Chem.*, 18, 778-781, 1972.
4. GLOWINSKI, J. y IVERSEN, L. L.: *J. Neurochem.*, 13, 655-669, 1966.
5. HABER, B. y KAMANO, A.: *Nature*, 210, 399-404, 1966.
6. HARDIN, C. M.: *Brain Res.*, 59, 437-439, 1973.
7. ILLNEROVA, H.: *Acta Nerv. Sup. (Praha)*, 14-2, 130-131, 1972.
8. INGEBORD, L., CROWLEY, W. R. y ZEMLAN, F. P.: *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 88, 53-61, 1975.
9. KATO, R.: *J. Neurochem.*, 6, 202-206, 1959.
10. KIKUYAMA, S.: *Anat. Zool. Jap.*, 34, 111-116, 1961.
11. KOE, K. B. y WEISSMAN, A.: *J. Pharmacol. Experim. Therap.*, 154, 499-515, 1966.
12. KORDON, C., JAVOY, F., VASSENT, G. y GLOWINSKI, J.: *Europ. J. Pharmacol.*, 4, 169-174, 1968.
13. LADOSKY, W. y GAZIRI, L. C. T.: *Neuroendoc.*, 6, 168-174, 1970.
14. MAICKEL, R. P., COX, R. H., SAILLANT, J. y MILLER, F. P.: *Int. J. Neuropharmacol.*, 7, 275-281, 1968.
15. MAICKEL, R. P. y MILLER, F. P.: *Anal. Chem.*, 38, 1937-1938, 1966.
16. MEYERSON, B. J.: *Acta Physiol. Scand.*, 63, Suppl. 241, 1-32, 1964.
17. O'STEEN, W. K.: *Endocrin.*, 74, 885-888, 1964.
18. PÉREZ-CRUET, T., TAGLIAMONTE, A., TAGLIAMONTE, P. y GESSA, G. L.: *Riv. Farmacol. Terap.*, 2, 27-34, 1966.
19. REINHARD, J. F. y WURTMAN, R. J.: *Life Sci.*, 21, 1741-1746, 1977.
20. SAAVEDRA, T. M., BROWSTEIN, M. y AXELROD, J.: *J. Pharmacol. exp. Therap.*, 186, 508-515, 1973.
21. SKILLEN, R. G., THIENES, C. H. y STRAIN, L.: *Endocrin.*, 69, 1099-1102, 1961.
22. TAGLIAMONTE, A., TAGLIAMONTE, P. y GESSA, G. L.: *Science*, 166, 1433-1435, 1969.
23. TAGLIAMONTE, A., TAGLIAMONTE, P., GESSA, G. L. y BROODIE, B. B.: *Nature*, 230, 244-245, 1971.
24. WELCH, A. S. y WELCH, B. L.: *Anal. Biochem.*, 30, 161-165, 1968.
25. WONG, D. T., BYMASTER, F. P., SUE CHEN y MOLLOY, B. B.: *Biochem. Pharmacol.*, 29, 935-941, 1980.

