

INSTITUTO DE ESPAÑA

ANALES
de la
REAL ACADEMIA
NACIONAL
DE
FARMACIA



2006

VOLUMEN LXXII

Núm. 3

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

28004 MADRID

Harmful algal blooms, red tides and human health: Diarrhetic shellfish poisoning and colorectal cancer

Recibido el 13 de septiembre de 2006

VICTORIA LOPEZ-RODAS¹, EMILIA MANEIRO¹,
JUAN MARTINEZ², MACARENA NAVARRO¹ &
EDUARDO COSTAS¹

¹*Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense,
28040. Madrid. Spain.*

²*Servicio de Medicina Preventiva y Salud Pública.
Hospital Carlos III. 28029. Madrid. Spain.*

ABSTRACT

Certain blooms of unicellular microscopic algae that change the colour of the seawater to a reddish tone are called red tides. Hundred kilometres of the sea seem blood during a red tide. In some cases the microalgal species of red tides produce toxins or/and anoxic conditions, causing massive mortalities of marine animals. The proliferation of toxic algae is denominated harmful algal blooms (HAB). The majority of the toxic and red tide species are dinoflagellates, which present fascinating nuclear features (permanently condensed chromosomes organized in stacked rows of parallel nested arches without histones). Considerable time and effort are required to identify a HABs species under light microscopy in monitoring programs. Nowadays, the use of alternative molecular probes (antibodies, lectins, DNA probes) that bind target harmful algae is an increasing procedure in monitoring programs.

* Corresponding author: Eduardo Costas, Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040. Madrid. Spain. Ecostas@vet.ucm.es

Abbreviations: harmful algal blooms (HAB), diarrhetic shellfish poisoning (DSP), colorectal cancer incidence (CRC).

Toxins produced by harmful species are transferred to food chain and cause numerous human intoxications with different clinical profile such as ciguatera fish poisoning (CFP), paralytic shellfish poisoning (PSP), neurotoxic shellfish poisoning (NSP), diarrhetic shellfish poisoning (DSP), and amnesic shellfish poisoning (ASP). DSP is perhaps the main public health (and economic) problem in Spain and Europe¹.

The principal measures to avoid DSP outbreaks are the monitoring of shellfish harvesting areas and toxin analysis. European legislation allows up to 0,16 µg of DSP toxins per gram of meat.

Nowadays, the debate raised by DSP is only as a toxin causing diarrhoea. However, we think that the residual levels of DSP toxins ingested through shellfish consumption could contribute to increase colorectal cancer incidence (CRC). An epidemiological study to correlate dietary customs and tumour incidence shows a statistically significant correlation ($p < 0.001$) between consumption of molluscs and the incidence of colorectal cancer (coefficient determination = 0.50). An increase of 7 times in shellfish consumption produced duplication in the risk ratio of CRC in the Spanish population. Further analysis is necessary to conclusive association between shellfish consumption and CRC. In a context of global change that favours blooms of toxic microalgae a good approach for public health would be to change legislation to reduce the presence of residual levels of DSP toxins OA in shellfish. This point of view produces a conflict between the economic interests of the sector and public health.

Keywords: HABs.—DSP.—Cancer risks.—Dinoflagellates.—Marine toxins.

RESUMEN

Proliferaciones algales tóxicas, mareas rojas y salud: envenenamiento diarreico por moluscos y cáncer colorrectal

Las grandes proliferaciones de microalgas unicelulares se denominan mareas rojas cuando cambian el color del agua del mar. Algunas de estas especies fitoplanctónicas producen potentes toxinas y/o condiciones ambientales anóxicas que son capaces de provocar mortandades masivas de animales marinos. Los episodios de proliferaciones de microalgas tóxicas se conocen en el mundo entero como «harmful algal bloom» (HAB).

La mayoría de las especies tóxicas y formadoras de mareas rojas forman parte del grupo de los dinoflagelados, los cuales presentan unas características nucleares fascinantes (cromosomas permanentemente condensados organizados en hileras amontonadas de arcos unidos en paralelo sin histonas). Se requiere un tiempo y un esfuerzo considerable para identificar las especies de algas peligrosas bajo el microscopio en los programas de monitorización. Por eso, en la actualidad, se está incrementando el uso de sondas moleculares (anticuerpos, lectinas, DNA) que marcan específicamente las células tóxicas diana de manera más eficaz.

Estos organismos son el inicio de la cadena trófica en el mar, por tanto las toxinas producidas por las especies tóxicas son transferidas a la cadena alimenticia y causan numerosas intoxicaciones en seres humanos con diferentes perfiles clínicos como el envenenamiento por ciguatera (CFP), envenenamiento paralizante (PSP), envenenamiento neurotóxico (NSP), envenenamiento diarreico y envenenamiento amnésico (ASP). El DSP constituye quizá el principal problema de salud pública (y económico) en España. Las principales medidas para evitar proliferaciones de DSP son la monitorización de las áreas de producción de moluscos y el análisis de la toxina. La legislación europea permite 0,16 µg de toxina DSP por gramo de carne.

Hoy en día el debate que se plantea es que el DSP es solamente una causa de diarrea. Sin embargo, nosotros pensamos que los niveles «legales» de toxinas DSP ingeridas al consumir moluscos pueden contribuir al incremento de la incidencia de cáncer colorectal (CRC). El estudio epidemiológico para correlacionar las costumbres dietéticas y la incidencia de tumores, muestra una correlación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre el consumo de moluscos y la incidencia de cáncer colorrectal (coeficiente de determinación = 0,50). Un incremento de siete veces el consumo de moluscos duplicará el riesgo de sufrir CRC en la población española. Es necesario realizar más estudios para asegurar de forma concluyente la relación entre el consumo de moluscos y el CRC. En un contexto de cambio global que favorece las proliferaciones de microalgas tóxicas, deberíamos reducir a cero los niveles residuales de toxinas DSP en moluscos. Este punto de vista da lugar a un conflicto entre los intereses económicos del sector y la sanidad de los alimentos.

Palabras clave: HABs.—DSP.—Riesgo de cáncer.—Dinoflagelados.—Toxinas marinas.

A BIBLICAL PLAGUE

«...all the waters that were in the river were turned to blood, and the fish that were in the river died...» (Exodus 7:20)

This biblical reference is believed to be the first written mention to a harmful algal bloom (HAB), which occurred about 3300 years ago in the Nile estuary. Certain blooms of unicellular microscopic algae are called «red tides» when planktonic microalgae grow in such abundance (up to millions per liter) that they change the colour of the seawater to a reddish tone. Red tides are extraordinary events. As bible describes, hundred kilometers of the sea seem blood during a red tide.

In some cases the microalgal species of red tides produce toxins that are deleterious to fauna. In other cases algal cells become so dense during the red tides that they produce anoxic conditions. As result red tides usually cause the death of thousands of marine animals (invertebrates, fishes, birds...), including vertebrates as big as monk seals and humpback whales (1-3).

Ancient proverbs and oral traditions of seaside peoples prevent against red tides and HABs effects. As an example, a popular tradition in NW of Spain warns people against eating mussels towards the end of the summer. Thousands cases of human poisoning by microalgal toxins (usually from shellfish consumption) are reported each year in the first world (4-5). But only recently we commence to understand how HABs, red tides, the marine ecosystem integrity, global change and human health are intimately linked.

MICROALGAE, HABS, AND RED TIDES

Marine unicellular microscopic algae generate 40% of primary production on the Earth (6-7). They form part of marine food chain and make higher life possible in oceans and shores, and allow human fisheries and aquaculture. Of the thousands of marine microalgae species (≈ 70000) that occurs in the sea, only a small number are harmful (8). Around a dozen produce red tides, and only 40 are known to be toxic (9). Not all red tides are toxic, and not all toxic microalgae produce red tides. When these species proliferate, they can cause massive mortality among marine organisms (Figure 1), damage marine cultures, fisheries, and human health (9-10). The proliferation of toxic algae is denominated harmful algal blooms (HAB). HAB may generate high densities of toxic population, but low dense population (200 cells/l or less) of some toxic species can be enough to cause poisoning (11).

DINOFLAGELLATES

The majority of the toxic and red tide species are dinoflagellates (9). Dinoflagellates comprise a widely diversified group of unicellular

protists (≈ 4000 species), which exhibit a great diversity in size (from a few μm to 2 mm), form and lifestyle (Figure 1). Ninety percent of all dinoflagellates are marine plankton, and the rest are benthic, freshwater or parasitic species. About half the species are free-life photosynthetic organisms, and the others are heterotrophic predators on bacteria, microalgae, other protists (including other dinoflagellates), fish eggs, saprophytes, take up residence within other organisms as symbiotic partners, and even parasites. Dinoflagellate biology is reviewed in detail in Lee (12) and Graham and Wilcox (7).

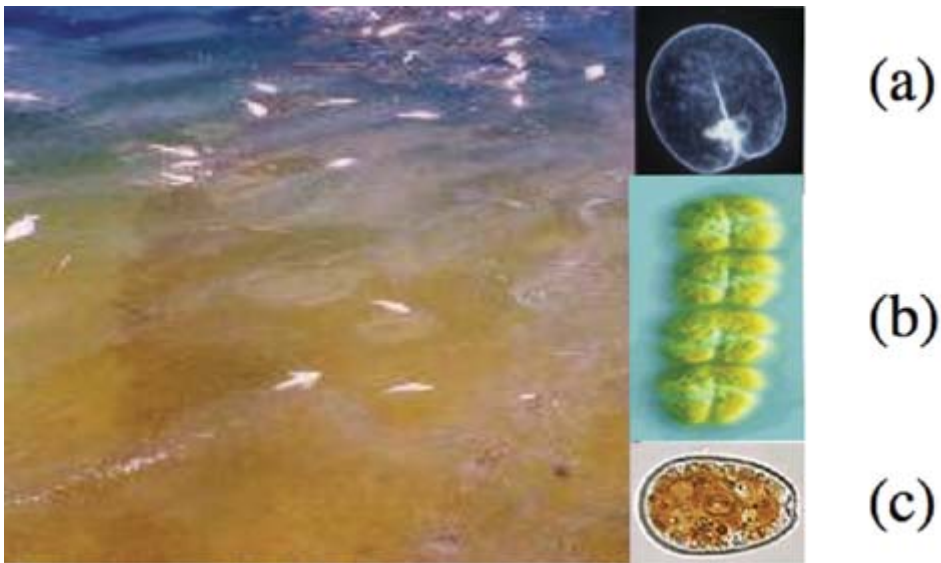


FIGURE 1. **Red tide and red tide-producing species.** a) red tide producing dinoflagellate (*Noctiluca*); b) PSP tide producing dinoflagellate (*Gymnodinium*); c) DSP producing dinoflagellae (*Prorocentrum*).

Dinoflagellates also present fascinating nuclear features that have intrigued researchers for many years (13-14). As examples, a dense nuclear matrix accommodates permanently condensed chromosomes that are composed by fibers organized without histones and nucleosomes in stacked rows of parallel nested arches (Figure 2). The macromolecular chromosome structure corresponds to cholesteric liquid crystals with a constant left-handed twist. RNA is determinant to maintain the chromosome structure. Whole mounted

chromosomes have a left-handed screw-like configuration, with coils, which progressively increase their pitch. Dividing chromosomes remain highly condensed. The nuclear envelope remains through the cell cycle showing spindle fibbers, which penetrate intranuclear cytoplasmic channels during mitosis constituting an extra nuclear spindle.

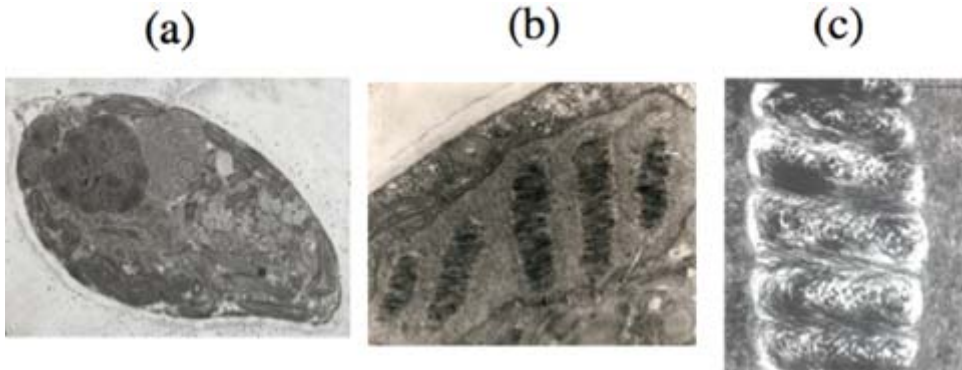


FIGURE 2. *Electron microscopy of dinoflagellate Prorocentrum lima.*
 a) Section of *Prorocentrum*: nucleus with cromosomas; b) permanently condensed chromosomes anchored in nuclear membrane; c) chromatin organization in arcs without histones.

These and other cytogenetic features suggest that dinoflagellates are a group of enigmatic protists, unique and different from the usual eukaryotes. In contrast, DNA sequence studies propose that dinoflagellates are true eukaryotes, closely related to apicomplexa, and ciliates (Alveolata) (15), suggesting that the unusual features of chromosome and nuclear organization are not primitive but derived characters. Nevertheless, dinoflagellates have reached enigmatic specific nuclear and chromosome solutions, extremely far from those of other living beings.

TOXINS

There are human intoxications with different clinical profile caused by marine species (fish and shellfish) consuming toxic algae: ciguatera fish poisoning (CFP), paralytic shellfish poisoning (PSP), neurotoxic shellfish poisoning (NSP), diarrhetic shellfish poisoning

(DSP), and amnesic shellfish poisoning (ASP). Toxins produced by harmful species are transferred to food chain throughout filtering organism and can remain active within them for long time. Briefly, the causative toxin responsible of PSP is saxitoxins (SXTs) and is produced by dinoflagellates *Alexandrium spp.*, *Gymnodinium catenatum*, and *Pyrodinium bahamense*. These toxins can be divided in two groups: SXTs 5-18 and neosaxitoxins 19-27. STXs are specific and potent agents that block the sodium channels in neuronal and muscular tissue, which prevents propagation of the action potential. The clinical profile is mainly neurological and their onset is rapid (within 30 minutes), there is a tingling or numbness around the lips, in the face and neck, a prickly sensation in the fingertips, headache, fever, nausea, vomiting and diarrhoea. The most severe cases result in respiratory arrest within 24 h of consumption of the toxic shellfish (mussels, oysters, scallops, clams). There is no antidote at the moment, only supportive therapy.

The intoxication caused by domoic acid and its congeners denominated ASP is produced by diatoms *Pseudonitzschia pungens f. multiseries*, *P. australis*, *P. pseudodelicatissima*, *P. seriata*, *Nitzschia actydropbila*, *Amphora coffeiformis*. The toxin, an excitatory amino acid, acts as an agonist to glutamate receptor (16), which conducts Na⁺ ion channels inducing depolarisation increasing the Ca⁺ ion permeability, which leads to cell death. Symptoms include gastroenteritis (within 24 h of the consumption of toxic shellfish) and in severe cases, neurological symptoms also appear, usually within 48 h. Dizziness, headache, disorientation, short-term memory loss, respiratory difficulty and coma are also observed (17).

Ciguatoxins (CTXs) and Maitotoxin (MTX) are the agents responsible for the CFP. The main causative organism is *Gambierdiscus toxicus*, an epiphytic dinoflagellate that produce a group of lipid-soluble toxins (polycyclic ethers) CTXs 28-37 and gambierol 38 (18). CFP affects more than 50,000 people annually, caused by ingestion of coral reef fishes. Ciguatoxins are potent neurotoxins, which act by binding quasi-irreversibly to site 5 on sodium channels, a site overlapping the brevetoxin binding site (19), causing them to open and modifying the sodium current. Several effects are consequently observed at motor nerve terminals (20). Ciguatera fish poisoning (CFP) produces gastrointestinal,

neurological and cardiovascular disorders. The gastrointestinal symptoms are diarrhoea, vomiting and abdominal pain occur, followed by neurological dysfunction including muscular aches, reversal of temperature sensation, dizziness, anxiety and a numbness and tingling of the mouth and digits. In the most severe cases, paralysis and death have been reported. The symptoms appear within 2 to 6 h, and the complete syndrome develops within 24 h and lasts around one week, but it may persist for weeks or months. Recovery time is variable, weeks, months or years. Rapid treatment (within 24 h) with mannitol and calcium is reported to relieve some symptoms (21). Prevention of intoxication depends on complete abstinence from eating any tropical reef fish.

NSP toxins are polycyclic ethers denominated brevetoxins (BTXs). The primary producer is a dinoflagellate *Gymnodinium breve*, which causes mass mortality of fish. Pharmacological studies have revealed that BTXs produce their damaging effects by acting on site 5 of voltage-sensitive sodium channels (22). NSP produces an intoxication syndrome nearly identical with that of ciguatera. In this syndrome, gastrointestinal and neurological symptoms predominate. The recovery is generally complete in a few days. In addition, formation of toxic aerosols by wave action during an algal bloom can produce respiratory asthma-like symptoms. No deaths have been reported and the syndrome is less severe than ciguatera.

However, in Spain Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) is perhaps the main problem at both public health and economic levels.

HABS AND DIARRHETIC SHELLFISH POISONING (DSP) SYNDROME

Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) is a human syndrome that is produced by the consumption of shellfish that feed DSP toxic-producing dinoflagellates (*Dinophysis* spp., *Prorocentrum lima*, *P. maculosum*, *Protoceratium reticulatum*). The first reported cases of DSP were in the Netherlands in the 1960s. In Spain the first toxic outbreak of DSP was registered in August 1978 in the Ría of Ares (La Coruña, NW Spain) (4). Repeated outbreaks of DSP are detected worldwide (23-25). During the last decades, it has been observed a

high percentage of DSP toxins present in some seafood products (25-26). Ingestion of contaminated shellfish or fish results in a wide variety of human symptoms, depending upon the toxins present, their concentrations and the amount of contaminated shellfish consumed. Diagnosis is based on observed symptomatology and recent dietary history. The principal target for the effects of the DSP toxins is the gastro-intestinal tract and the clinical profile of DSP is characterised by nausea, vomiting, diarrhoea, abdominal pain, shivering, headaches and fever. Depending on the dose of toxin ingested, the onset may vary from 30 minutes to 12 hours after ingestion. Complete recovery is even in severe cases 2-3 days with or without medical treatment (23, 27).

The DSP toxins comprise a group of high molecular weight polyethers (Okadaic acid and dinophysistoxins, pectenotoxins, yessotoxins, and azaspiracids) (28). The main toxin responsible of DSP is okadaic acid (OA), a cyclic C38 polyether fatty that is concentrated by shellfish in their digestive glands (29-30). Detection of DSP toxins is performed by HPLC or mouse bioassay, concentration is expressed in okadaic acid equivalents ($\mu\text{g OA/g meat}$).

MONITORING, REGULATION AND PREVENTION OF DSP TOXINS

Shellfish is one of the main commercial productions in aquaculture industry. Shellfish associated with human outbreaks of DSP are mainly mussels, oysters, clams and scallops (26, 31). European legislation allows up to 0,16 μg Okadaic acid equivalent per gram of meat (Decision 2002/225/CE) (28).

The principal measures to avoid DSP outbreaks are the monitoring of shellfish harvesting areas and analysis for toxins. A major constraint to monitoring programs for HABs and marine biotoxins is the need to identify the microalgal species responsible for toxicity. The identification and enumeration of cells of potentially dangerous species within a mixed plankton assemblage is a serious problem. If the toxic alga is unknown, a lot of work is necessary to see whether toxin presence and algal occurrence are related. In

addition, some species are so toxic that they can produce serious problems occurring at such a low density that they are virtually invisible to cell counts in monitoring programs. Considerable time and effort are required to identify a particular species especially when its distinguishing characteristics are difficult to discern under light microscopy (5).

Invariably, microalgae maintain a fixed morphology, whilst accumulating genetic variability within them. Hence, while great effort is required to identify and counting toxin-producing microalgae using microscopy, misidentification may appear if morphology is the unique criterion for the identification of toxin producing species. A working alternative is the use of molecular probes that can bind species-specific sites on target harmful algae, to be visualized using flow-cytometry, spectrofluorometry, or epifluorescence microscopy. The use of immunological (32-33), lectin-based (34-35) and DNA based probes (36) for harmful algal species identification is increasing in monitoring programs. These cellular and molecular probes allow a precise identification that is impossible using classic microscopic identification. As an example of misidentification, the red tide non-toxic dinoflagellate *Gyrodinium impudicum* was continuously confused with the PSP toxin-producing dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *G. impudicum* is so morphologically similar to *G. catenatum* that both species cannot be distinguished in formalin fixed samples. However, both species can be easily differentiated using the WGA lectin, which specifically binds to *G. catenatum*. Misidentification during decades between these species originated enormous economic losses when shellfish yield was forbidden after detect the innocuous species *G. impudicum* in water samples (5).

Shellfish yield is forbidden when the toxins exceed the prescribed limits providing a margin of safety to prevent contaminated shellfish reach the market. In spite of regulation on DSP toxins are usually taking into account, repeatedly outbreaks of DSP provoked by ingestion of mussels have been reported in European countries (24, 37). Even recently, shellfish contained more than 0,16 µg/g of okadaic acid have been detected in UE markets (25-26, 38). In addition, DSP outbreaks are probably undervalued because DSP is a self-limited and mild disease, and the most patients with DSP are detected when

suffering the symptoms and not through a screening (37). No human mortalities to date have been reported from any cases of DSP poisoning, although there has been considerable morbidity resulting in hospitalisation (39).

OA AND CANCER

Cancer is an important problem in public health worldwide. Colorectal cancer (CRC) is the second most frequent cause of death from cancer in the more developed regions of the world (40). While CRC mortality declined several years ago in most countries in the European (from 1950 to 1990's), mortality rates continues to increase for Spain (41). Spain has experienced a mean yearly increase higher in men (2.6%) than women (0,8%) since 1975, although there is a tendency towards stabilization (42).

A considerable number of environmental influences (mainly dietary factors) may play an important role in the development of CRC (41,43-46). In addition to that, hereditary factors have been observed in the aetiology of CRC (47).

OA can be a cancer-promoter. Numerous studies show that OK induces morphological transformation of cells (48-49), and micronucleus promoting (50). OA induce mutations and gene deregulation at low concentrations (51). OA also has growth-promoting effects on human cells (52-53). In addition, OA has been reported to be a tumor promoter of cancer in animal models, mainly related to skin, stomach and colon cancer (23, 54).

However, scarce works notice on real health-risk of consuming DSP toxins (39). The DSP syndrome is most prevalent in Europe, Japan and Chile, where aquaculture are extensively carried out (55). The regular shellfish consumers are exposed to continuous uptake of sub-acute levels of DSP toxins.

A HYPOTHESIS: OA AND COLORECTAL CANCER?

Several epidemiological studies associate CRC and dietary practices (47, 56-57). We propose that the residual levels of DSP

toxins ingested through shellfish consumption could contribute to increase CRC incidence.

To support our hypothesis (a shellfish consumers have a statistically significant higher risk to suffer colorectal cancer than a no-shellfish consumers), we have performed an epidemiological study to correlate dietary customs and tumour incidence. The data of epidemiological study were obtained from the latest available survey (1991) on habitual diet reflected into National Survey on Nutrition and Food (*Encuesta Nacional de Nutrición y Alimentación-ENNA-91*). The tumours incidence (rate of incidence in hospital admissions in cases per 100,000 population) was obtained from the Hospital Morbidity Survey (*Encuesta de Morbilidad Hospitalaria*) of 2003 (EMH - 03). The selected exposure variables were the consumption of fresh bivalve molluscs (mussels, clams, cockles) as the problem variable, and other food (bread, meat and meat products, fish, fresh fruit, olive oil, milk and dairy products) as control variables. The minimum of total admissions (CMBD) was coded in accordance with the International Classification of Diseases. We calculated regression, determination coefficients, confidence interval and others using Epi-Info, version 6.04 (58).

The output on epidemiological study (Figure 3) has established a statistically significant correlation ($p < 0.001$) between consumption of molluscs and the incidence of colorectal cancer (coefficient determination = 0.50). A correlation between the consumption of molluscs and the total incidence of tumours was also observed (Table 1). The consumption of other food was not associated with colorectal cancer (with the exception of total meat consumption, which is a known risk factor for this disease). An association between shellfish consumption and meat consumption was also observed ($r^2 = 0.39$; $p < 0.01$). In the Spanish population, an increase of 7 times in shellfish consumption produces duplication in the risk ratio of CRC (Table 2).

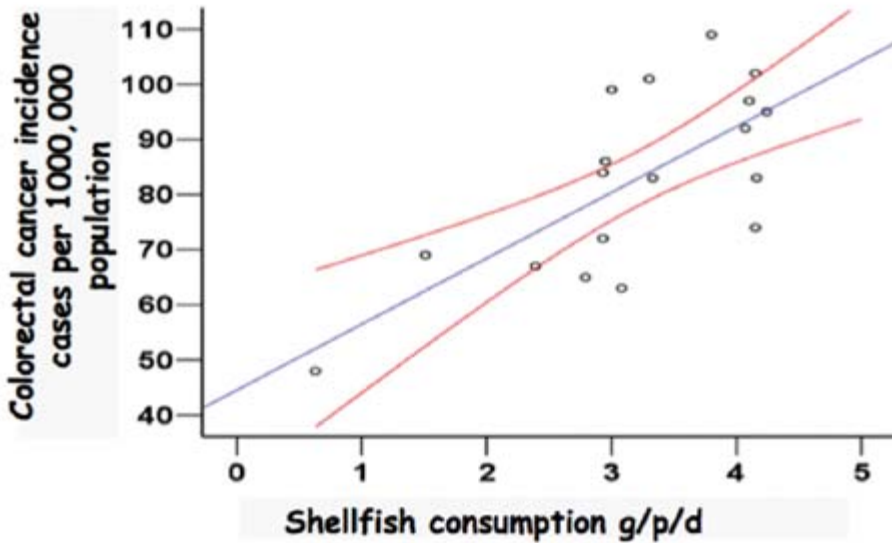


FIGURE 3. Correlation ($p < 0.001$) between consumption of molluscs and the incidence of colorectal cancer.

TABLE 1. Values of determination coefficients and confidence interval for each of the food items

	Total tumours				Colorectal cancer			
	Upper limits	R ²	Upper limits	P	Upper limits	R ²	Upper limits	P
Shellfish	-0,02	0,45	0,76	<0,01	0,04	0,50	0,78	<0,01
Bread	-0,68	0	0,68	>0,05	-0,46	0,01	0,47	>0,05
Fish	-0,67	0,02	0,69	>0,05	-0,68	0,01	0,69	>0,05
Fruit	-0,38	0,11	0,55	>0,05	-0,28	0,22	0,62	>0,05
Oil Olive	-0,45	0,02	0,48	>0,05	-0,44	0,03	0,49	>0,05
Milk	-0,38	0,1	0,54	>0,05	-0,36	0,13	0,56	>0,05
Meat	-0,12	0,36	0,71	>0,05	0,05	0,51	0,79	<0,01

TABLE 2. *Relative risk of colorectal cancer with increase of relative shellfish consumption in Spain*

Spanish Comunidad Autonoma	Relative Risk Consumption	Relative Risk colorectal cancer
CANARIAS	1	1
ASTURIAS	6,7	2
MADRID	6,6	1,8

Further analysis is necessary to conclusive association between shellfish consumption and CRC. In this sense, we are working in animal models and other epidemiological models. Nowadays, the debate raised by OA is only as a toxin causing diarrhoea. This study provides evidence that the hypothesis of the relation between OA and colon cancer should begin to be taken into consideration. Unfortunately, this point of view produces a conflict between the economic interests of the sector and public health. In a context of global change and coastal eutrophication that favours blooms of toxic microalgae a good approach for public health would be to change legislation to reduce the presence of OA in shellfish to zero. Although cost-benefit studies may throw light on the problem in the future, we believe that in a controversial situation such as this it would be well to remember the Hippocratic dictum of «primum non nocere».

BIBLIOGRAPHY

- (1) ANDERSON, D. M. (1994): Red Tides. *Sci. Amer.* 271: 52-59.
- (2) HERNÁNDEZ, M.; ROBINSON, I.; AGUILAR, A.; GONZÁLEZ, M. L.; LÓPEZ L. F.; REYERO, I.; CACHO, E.; FRANCO, J.; LÓPEZ-RODAS, V. y COSTAS, E. (1998): Did algal toxins cause monk seal mortality? *Nature.* 339: 28-29.
- (3) COSTAS, E. y LÓPEZ-RODAS, V. (1998): Paralytic phycotoxins in monk seal mass mortality. *Vet. Rec.* 142: 643-464.
- (4) FRAGA, S.; MARIÑO, J.; BRAVO, I.; MIRANDA, A.; CAMPOS, M. J.; SÁNCHEZ, F. J.; COSTAS, E.; CABANAS, J. M. y BLANCO, J. (1984): Red tides and shellfish poisoning in Galicia (NW Spain). *ICES* 5: 1-12.
- (5) COSTAS, E. (1997): Red tides and toxic algal blooms: who's to blame? *Lagascalia.* 19: 165-178.

- (6) FALKOWSKI, P. G. y RAVEN, J. A. (1997): Aquatic Photosynthesis. Malden, MA, USA. Blackwell Science.
- (7) GRAHAM, L. E. y WILCOX, L. W. (2000): Algae. Upper Saddle River NJ, USA. Prentice Hall.
- (8) PEPPERZAK, L. (2005): Future increase in harmful algal blooms in the North Sea due to climate change. *Water Sci. Technol.* 51: 31-36.
- (9) SOURNIA, A. (1995): Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into biodiversity en: Harmful Marine Algal Blooms (L. Patrick Ed.) 103-112.
- (10) YAN, T. and ZHOU, M. J. (2004): Environmental and health effects associated with Harmful Algal Bloom and marine algal toxins in China. *Biomed. Environ. Sci.* 17: 165-176.
- (11) KEAFER, B. A.; CHURCHILL, J. A. and ANDERSON D. A. (2005): Blooms of the toxic dinoflagellate, *Alexandrium fundyense* in the Casco Bay region of the western Gulf of Maine: Advection from offshore source population and interactions with the Kennebec River plume. *Deep-Sea Research II*: 2631-2655.
- (12) LEE, R. E. (1999): Phytology. Cambridge University Press, UK.
- (13) COSTAS, E. y GOYANES, V. J (1987): Ultrastructure and división behaviour of dinoflagellate chromosomes. *Chromosoma.* 95: 435-441.
- (14) COSTAS, E. y GOYANES, V. (2005): Architecture and evolution of dinoflagellate chromosomes: an enigmatic origin. *Cytogenet. Genome Res.* 109: 268-275.
- (15) ZARDOYA, R.; COSTAS, E.; LÓPEZ-RODAS, V.; GARRIDO, A. y BAUTISTA, J. M. (1995): Revised dinoflagellate phylogeny inferred molecular analysis of large-subunit ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.* 41: 637-645.
- (16) HAMPSON, D. R.; HUANG, X. P.; WELLS, J. W.; WALTER, J. A. and WRIGHT, J. L. (1992): Interaction of domoic acid and several derivatives with kainic acid and AMPA binding sites in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 218: 1-8.
- (17) PERL, T. M.; DEDARD, L.; KOTSATSKY, T.; HOCKIN, J. C.; TODD, E. C. D. and REMIS, M. D. (1990): An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *N. Eng. J. Med.* 322: 1775-1780.
- (18) YASUMOTO, T. and MURATA, M. (1993): Marine toxins. *Chem. Rev.* 93: 1897-1909.
- (19) POLL, M. A.; LEWIS, R. J.; DICKEY, R. W.; MUSSER, S. M.; BUCKNER, C. A. and CARPENTER, L. G. (1997): Identification of Caribbean ciguatoxins as the cause of an outbreak of fish poisoning among US soldiers in Haiti. *Toxicol.* 35: 733-741.
- (20) MOLGÓ, J.; DECHRAOUI, M. Y.; JUZANS, P.; MOROT-GAUDRY, Y.; MATTEI, C. and LEGRAND, A. M. (1998): Sodium-dependent alterations of synaptic transmission mechanisms by brevetoxins and ciguatoxins. In: Harmful Algae (Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M. L., Wyatt, T., Eds.), pp. 594-597. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- (21) PALAFOX, N. A., JAIN, L. G., PINANO, A. Z., GULICK, T. M., WILLIAMS, R. K., SCHATZ, I. J. (1988): Successful treatment of ciguatera fish poisoning with intravenous mannitol. *JAMA.* 259: 2740-2742.

- (22) CESTELE, S.; SAMPIERI, F.; ROCHAT, H. and GORDON, D. (1996): Tetrodotoxin reverses brevetoxin allosteric inhibition of scorpion alphatoxin binding on rat brain sodium channels. *J. Biol. Chem.* 271: 18329-18332.
- (23) AUNE, T. and YNDESTAD, M. (1993): Diarrhetic shellfish poisoning. In *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water* (I. Falconer, Ed.), pp. 87-104. Academic Press, New York.
- (24) VALE, P. and SAMPAYO, M. A. (2002): First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicol.* 40: 989-996.
- (25) VALE, P. and SAMPAYO, M. A. (2003): Seasonality of diarrhetic shellfish poisoning at a coastal lagoon in Portugal: rainfall patterns and folk wisdom. *Toxicol.* 41: 187-197.
- (26) JORGENSEN, K.; SCANLON, S. and JENSEN, L. B. (2005): Diarrhetic shellfish poisoning toxin esters in Danish blue mussels and surf clams. *Food Addit. Contam.* 22: 743-751.
- (27) YASUMOTO, T. and SATAKE, M. (1998): New toxins and their toxicological evaluations. In Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae* (June 1999, Vigo, Spain), pp. 461-464. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- (28) COMMISSION DECISION OF 15 MARCH (2002): Laying down rules for the implementation of Council Directive 91/492/EEC as regards the maximum levels and the methods of analysis of certain marine biotoxins in bivalve molluscs, echinoderms, tunicates and marine gastropods. *Off. J. Eur. Communities* (2002/225/EC) L 75/62-63.
- (29) SVENSSON, S.; SARNGREN, A., FORLIN, L. (2003): Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane glycoprotein activity. *Aquat. Toxicol.* 65: 27-37.
- (30) TORGERSEN, T.; AASEN, J. and AUNE, T. (2005): Diarrhetic shellfish poisoning by okadaic acid esters from Brown crabs (*Cancer pagurus*) in Norway. *Toxicol.* 46: 572-578.
- (31) RAMSTAD, H.; HOVGAARD, P.; YASUMOTO, T.; LARSEN, S. and AUNE, T. (2001): Monthly variations in diarrhetic toxins and yessotoxin in shellfish from coast to the inner part of the Sognefjord, Norway. *Toxicol.* 39: 1035-1043.
- (32) MENDOZA, H.; LÓPEZ-RODAS, V.; GONZÁLEZ, S.; AGUILERA, A. y COSTAS, E. (1995): The use of polyclonal antisera and blocking of the antibodies in the identification of marine dinoflagellates: specie-specific and clone-specific antisera against *Gymnodinium* and *Alexandrium*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 186: 103-115.
- (33) COSTAS, E. y LÓPEZ-RODAS, V. (1996): Enumeration and separation of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* from natural samples using immunological procedures with blocking antibodies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 198: 81-87.

- (34) COSTAS, E.; GONZÁLEZ DE CHÁVARRI, E.; AGUILERA, A.; GONZÁLEZ, S. y LÓPEZ-RODAS, V. (1993): Use of lectins to recognize and differentiate unicellular algae. *Bot. Mar.* 36: 1-4.
- (35) COSTAS, E. y LÓPEZ-RODAS, V. (1994): Identification of marine dinoflagellates using fluorescent lectins. *J. Phycol.* 30: 987-990.
- (36) COSTAS, E.; ZARDOYA, R.; BAUTISTA, J. M.; GARRIDO, A.; ROJO, C. y LÓPEZ-RODAS, V. (1995): Morphospecies vs. Genospecies in toxic marine dinoflagellates: an análisis of gymnodinium catenatum/Gyrodinium impudicum and Alexandrium minutum/ A. lusitanicum using antibodies, lectins and gene sequences. *J. Phycol.* 31: 801-807.
- (37) DE SCHRIJVER, K.; MAES, I.; DE MAN, L. and MICHELET, J. (2002): An outbreak of diarrhoeic shellfish poisoning in Antwerp, Belgium. *Euro Surveill.* 7: 138-141.
- (38) AASEN, J. A.; HARDSTAFF, W.; AUNE, T. and QUILLIAM, M. A. (2006): Discovery of fatty acid ester metabolites of spirolide toxins in mussels from Norway using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 1531-1537.
- (39) BURGESSA, V. AND SHAWB, G. (2001): Pectenotoxins, an issue for public health. A review of their comparative toxicology and metabolism. *Environment International* 27: 275-283.
- (40) SANT, M.; AARELEID, T.; BERRINO, F.; BIELSKA LASOTA, M.; CARLI, P. M.; FAIVRE, J.; GROSCLAUDE, P.; HÉDELIN, G.; MATSUDA, T.; MÖLLER, H.; MÖLLER, T.; VERDECCHIA, A.; CAPOCACCIA, R.; GATTA, G.; MICHELI, A.; SANTAQUILANI, M.; ROAZZI, P.; LISI, D. and THE EUROCARE WORKING GROUP (2003) EUROCARE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94 —results and commentary. *Ann. Oncol.* 14 (Supplement 5), v61-v118.
- (41) BOYLE, P.; D'ONOFRIO, A.; MAISONNEUVE, P.; SEVERI, G.; ROBERTSON, C.; TUBIANA, M. and VERONESI, U. (2003): Measuring progress against cancer in Europe: has the 15% decline targeted for 2000 come about? *Ann. Oncol.* 14: 1312-1325.
- (42) LÓPEZ-ABENTE, G.; POLLAN, M.; ARAGONES, N. and PÉREZ-GÓMEZ, B. (2003): Informe sobre la salud de los españoles. Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Instituto Carlos III. Noviembre de 2002.
- (43) BERRINO, F.; KROGH, V. and RIBOLI, E. (2003): Epidemiology studies on diet and cancer. *Tumori.* 89: 581-585.
- (44) BENITO, E. and CABEZA, E. (1993): Diet and cancer risk: an overview of Spanish studies. *Eur. J. Cancer Prev.* 2: 215-219.
- (45) BINGHAM, S.; DAY, N.; LUBEN, R.; FERRARI, P.; SLIMANI, N.; NORAT, T.; CLAVEL-CHAPÉLON, F.; KESSE, E.; NIETERS, A. and BOEING, H. (2003): Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *The Lancet* 361: 1496-1501.
- (46) WILLETT, C. (1999): Technical advances in the treatment of patients with rectal cancer. *Int. J. Radiation.* 45: 1107-1108.
- (47) DE LA CHAPÉLLE, A. (2004): Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 4: 769-780.

- (48) SHEU, C. W.; RODRÍGUEZ, I.; DOBRAS, S. N. and LEE, J. K. (1995): Induction of morphological transformation in BALB/3T3 mouse embryo cells by okadaic acid. *Food Chem. Toxicol.* 33: 883-885.
- (49) FUJITA, M.; GOTO, K.; YOSHIDA, K.; OKAMURA, H.; MORIMOTO, H.; S. KITO, S. and FUKUDA, T. HANEJI (2004): Okadaic acid stimulates expression of Fas receptor and Fas ligand by activation of nuclear factor kappa-B in human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncology.* 40: 199-206.
- (50) LE HEGARAT, L.; FESSARD, V.; POUL, J. M.; DRAGACCI, S. and SANDERS, P. (2004): Marine toxin okadaic acid induces aneuploidy in CHO-K1 cells in presence of rat liver postmitochondrial fraction, reveled by cytokinesis-block micronucleus assay coupled to FISH. *Environ. Toxicol.* 19: 123-128.
- (51) CREPPY, E. F.; TRAORE, A.; BAUDRIMONT. I.; CASCANTE, M. and CARRATU, M. R. (2002): Recent advances in the study of epigenetic effects induced by the phycotoxin okadaic acid. *Toxicology.* 181-182: 433-439.
- (52) JAHAN, I.; IJIMA, M.; KONDO, T. and NAMBA, M. (1996): Effects of okadaic acid on cell growth, anchorage-independent growth, and co-cultures of normal (KMS-6), immortalized (KMST-6), and neoplastically transformed (KMST-6T and KMST-6/RAS) human fibroblasts. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122: 249-253.
- (53) FUJIKI, H. AND SUGANUMA, M. (1993): Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv. Cancer Res.* 61: 143-194.
- (54) SUGANUMA, M.; TATEMATSU, M.; YATSUNAMI, J.; YOSHIKAWA, S.; OKABE, S.; UEMURA, D. and FUJIKI, H. (1992): An alternative theory of tissue specificity by tumor promotion of okadaic acid in glandular stomach of SD rats. *Carcinogenesis.* 13: 1841-1845.
- (55) ZHAO, J.; LEMBEYE, G.; CENCI, G.; WALL, B. and YASUMOTO, T. (1993): Determination of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in mussels from Chile, Italy and Ireland. In: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Smayda, J. and Shimizu, Y. (eds) Amsterdam, Netherlands Elsevier Science Publishers, pp. 587-92.
- (56) MONROE, K. R.; HANKIN, J. K.; PIKE, M. C.; HENDERSON, B. E.; STRAM, D. O.; PARK, S.; NOMURA, A. M.; WILKENS, L. R. and KOLONEL, L. N. (2003): Correlation of Dietary Intake and Colorectal Cancer Incidence Among Mexican-American migrants: The Multiethnic Cohort Study. *Nutrition and Cancer* 45: 133-147.
- (57) ALMENDINGEN, K.; HOFSTAD, B. and VATN, M. H. (2004): Dietary habits and growth and recurrence of colorectal adenomas: results from a three-year endoscopic follow-up study. *Nutr. Cancer* 49: 131-138.
- (58) DEAN, A. G.; DEAN, J. A.; COULOMBIER, D.; BRENDEN, K. A. and BURTON, A. H. (1997): Epi Info, Version 6.04: A word-processing database and statistics program for public health on IBM compatible microcomputers. Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control and Prevention.

Ecotoxicología y acción toxicológica del plomo

Recibido el 18 de septiembre de 2006

ANTONIO L. DOADRIO VILLAREJO¹
Académico de Número de la RANF

RESUMEN

Se realiza una revisión de la presencia del plomo en las cadenas tróficas, a partir de sus fuentes de contaminación, tanto naturales como antropogénicas, su metabolismo en el ser humano, así como de los efectos tóxicos que producen las distintas especies de plomo, su interés como contaminante y su tratamiento.

Palabras clave: Plomo.—Toxicidad.—Contaminación.

ABSTRACT

Lead ecotoxicology

This work is a revision of the presence of lead in the nutritional chains, from its sources of contamination, their metabolism, as well as of the poisonous effects that produce the different lead species, their interest like polluting agent and its treatment.

Key words: Lead.—Toxicity.—Pollution.

¹ E mail: adoadrio@raf.es

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE INTERÉS BIOLÓGICO

El plomo, en las cadenas tróficas, está presente en dos grupos de especies químicas, las inorgánicas, de mayor trascendencia y, las orgánicas, con características diferentes. Las especies inorgánicas, dentro de las cadenas tróficas, están constituidas principalmente por Pb metal, los óxidos y una única especie iónica, el catión divalente Pb^{2+} . Las especies orgánicas son habitualmente las alquiladas¹.

El Pb^{2+} , soluble en agua en forma de bicarbonato, está presente en las aguas de bebida. Una vez absorbido, por su característica de ácido blando, forma complejos con ligandos biológicos, preferentemente con átomos dadores de azufre, siendo el aminoácido preferido la cisteína, con el cual forma un complejo estable. El Pb metal y el PbO, en forma de partículas, se encuentran en la atmósfera y son fuentes continuas de contaminación.

De las especies orgánicas, las que más interés han suscitado son el tetraetil y tetrametil Pb, componentes de las gasolinas y que se lanzan a la atmósfera en forma de haluros en un proceso de arrastre provocado por los motores con derivados alquílicos de cloro o bromo, o bien directamente en las descargas de combustibles. Estas especies son liposolubles y fácilmente absorbibles, acumulándose en glóbulos rojos y pueden atravesar la barrera hematoencefálica.

PRINCIPALES COMPUESTOS DE PLOMO (1, 2)

Óxidos de plomo

El óxido de plomo(II) PbO es estable y se usa en pigmentos y en la manufactura de esmaltes vítreos y vidrios cerámicos. Existe en dos formas cristalinas, una amarilla y otra roja. El óxido Pb_3O_4 es un óxido mixto de Pb(II) y Pb(IV), de color rojo utilizado en pinturas (minio) y el óxido de Pb(IV), de color chocolate, es muy estable y oxidante, empleándose en síntesis orgánica, tinción y pirotecnia, entre otros usos. Son bastante insolubles, a excepción del minio.

Haluros de plomo

Son poco solubles. El PbCl_2 se usa como pigmento o como soldador y fundente.

Oxosales

Las principales oxosales con riesgo tóxico son: el nitrato $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, el sulfato PbSO_4 , el cromato PbCrO_4 , y el carbonato básico de plomo $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$. El nitrato, que es soluble en agua, se emplea como mordiente, en técnicas de grabado y en explosivos, principalmente. Tanto el sulfato como el carbonato son insolubles en agua y son pigmentos blancos, utilizados en pinturas y plásticos (blanco de plomo). Además, el sulfato en forma de sulfato tribásico $3\text{PbO} \cdot \text{PbSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se emplea como estabilizante del PVC. Por último, el cromato, también insoluble, es un pigmento amarillo usado en pinturas y plásticos.

Compuestos orgánicos

Los de mayor interés toxicológico son los derivados alquílicos de plomo (IV), teraetilo, dietilo, tetrametilo y dimetilo, empleados como antidetonantes de gasolinas, cuyo uso va disminuyendo por la imposición de las gasolinas sin plomo. Son liposolubles y volátiles y se descomponen lentamente, con formación de Pb.

PRESENCIA EN LA NATURALEZA: BIODISPONIBILIDAD Y BIOMOVILIZACIÓN

El plomo es muy abundante en la corteza terrestre (13 ppm) y con una buena distribución geográfica, muy homogénea, lo que le hace estar muy biodisponible.

La incorporación de plomo a las cadenas tróficas es abundante, ya que su biomovilización es muy buena a partir de sus minerales, especialmente la galena PbS , constituyendo una fuente de contami-

nación natural muy importante, y que supone que el ser humano haya estado en contacto con este metal desde tiempos remotos.

La biomovilización del plomo se puede representar en el siguiente esquema:



Es necesario, en este caso, la actuación de dos agentes atmosféricos, el oxígeno y el dióxido de carbono, ya que el primer ataque con O_2 , conduce a la formación de la especie PbSO_4 , muy poco soluble en agua, lo que es remediado por el posterior ataque del CO_2 , que reacciona con el sulfato de plomo para producir el bicarbonato de plomo, muy soluble, y que se incorpora a las cadenas tróficas a partir de su disolución en las aguas continentales donde está presente en forma iónica Pb^{2+} .

FUENTES DE CONTAMINACIÓN

Las fuentes de contaminación pueden ser naturales o antropogénicas, como es habitual en estos metales tóxicos.

El aporte de plomo a la fuente natural de contaminación es debida fundamentalmente al proceso de biomovilización a partir de sus depósitos naturales, al propio proceso de erosión de las rocas y al vulcanismo.

Se pueden distinguir tres tipos de fuentes antropogénicas:

Estacionarias. Debidas a la minería, el refinado y fundición de metales y a otros procesos industriales.

Móviles. Uso de las gasolinas con plomo en vehículos a motor.

Químicas. Por contaminación de fertilizantes, plaguicidas y desechos orgánicos.

También, se pueden clasificar las fuentes antropogénicas según su uso en:

Uso industrial. Fábricas de baterías, de vidrio, de pinturas y barnices; imprentas; minería; vertidos y desechos.

Uso doméstico. Pinturas; conservas (soldaduras de plomo); red doméstica de cañerías; revestimientos vitrificados (PbO); baterías de coches; combustión de gasolinas y humo de tabaco.

Uso agrícola. Fungicidas, herbicidas y pesticidas ($Pb_3(AsO_4)_2$).

El plomo está muy presente por tanto en las cadenas tróficas, siendo probablemente el metal de mayor interés toxicológico. Sus usos son muy antiguos, ya que desde el año 7.000 a.C. era utilizado por los egipcios en cerámicas. Los babilonios lo emplearon en sus jardines colgantes como impermeabilizantes y los romanos realizaron extracciones masivas del metal.

Su intensivo uso en la fabricación de contenedores de alimentos, aditivo de vinos, pinturas y barnices, fabricación de vidrio, baterías o como antidetonante de gasolinas, entre otras muchas aplicaciones, junto a los peligros que supone su manufactura y fundición, y su presencia en la red doméstica de agua potable, han convertido al plomo en un metal de alto riesgo tóxico.

CICLO NATURAL DEL PLOMO

Un esquema de este ciclo lo podemos ver en la Figura 1, en la que se puede apreciar cómo la incorporación del plomo a las cadenas tróficas tiene lugar tanto por la hidrosfera como por la litosfera y por la atmósfera.

BIOCONCENTRACIÓN DE PLOMO

El plomo puede ser bioconcentrado por animales marinos y dar lugar a intoxicaciones de tipo accidental. Los peces depredadores, mariscos, almejas, entre otros, son capaces de concentrar este metal presente en las aguas hasta en factores superiores a 100.000.

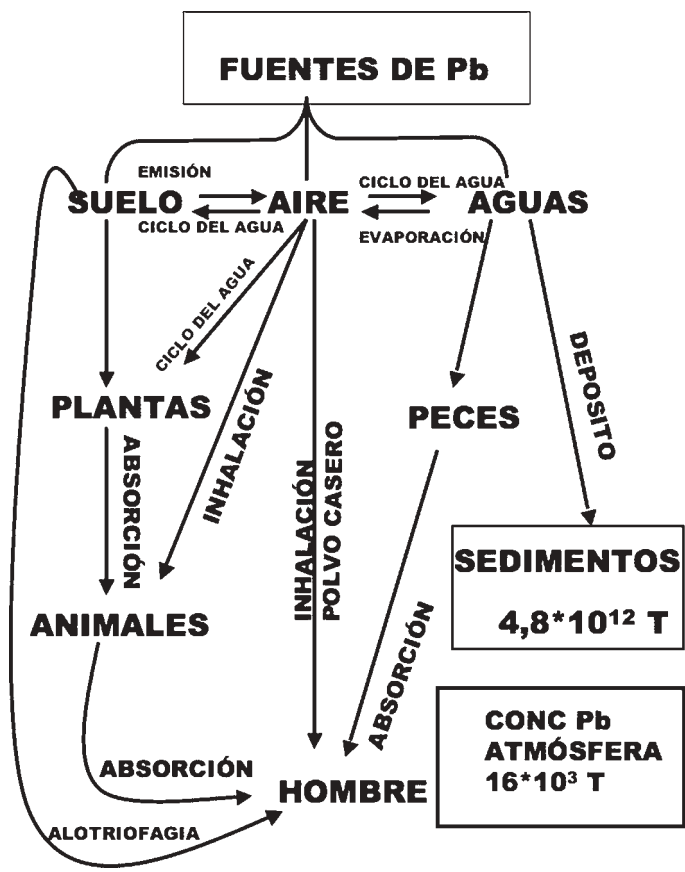


FIGURA 1. *Ciclo natural del plomo.*

METABOLISMO DEL PLOMO (3, 4, 5)

El plomo se absorbe por todas las vías: gastrointestinal, respiratoria y dérmica. En la Figura 2 se muestra un esquema del metabolismo del plomo en el ser humano.

Las especies inorgánicas son bastante absorbibles vía digestiva, dependiendo de su mayor solubilidad. Por vía respiratoria, la absorción debe ser en polvo y en forma soluble. Por su parte, los compuestos orgánicos liposolubles se absorben por las tres vías, lo que les hace potencialmente peligrosos.

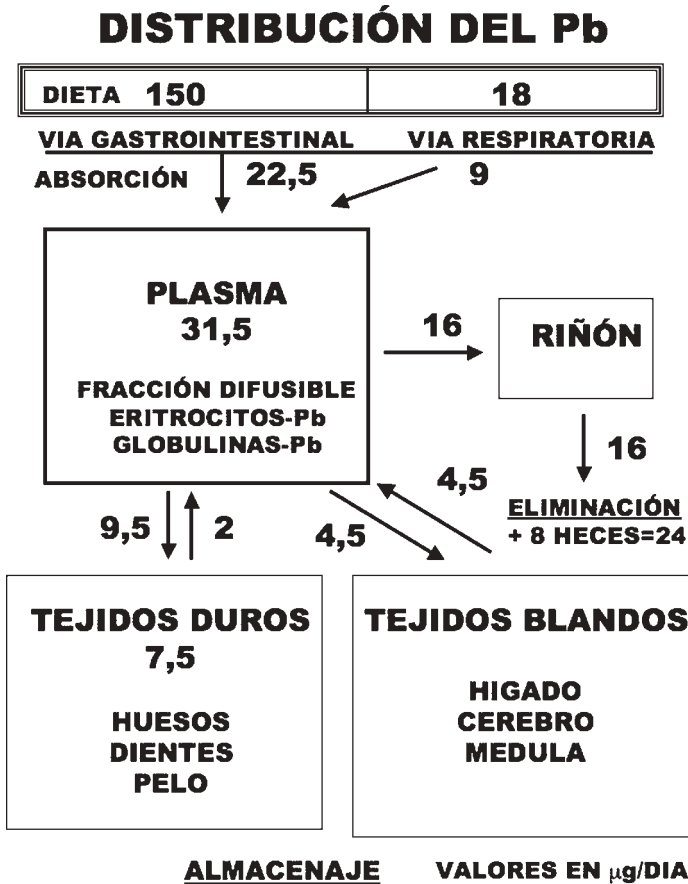


FIGURA 2. *Distribución del plomo en el ser humano.*

La absorción media por vía oral es de un 10%, mientras que la respiratoria puede llegar hasta el 50%, lo que la hace hasta cinco veces más eficaz.

Se estima que la absorción diaria de plomo es de 31,5 µg, de los que 16 se eliminan por riñón (24 µg total se eliminan contando con los 8 de las heces), distribuyéndose 9,5 en tejidos duros y 4,5 en blandos aproximadamente. De la fracción de tejidos, 2 µg diarios revierten a plasma desde los tejidos duros. El plomo se almacena principalmente en huesos, sustituyendo al calcio en la hidroxipatita, donde se almacena en forma no tóxica.

El contenido de plomo en tejidos depende en gran medida de la dieta. Una adición de lactosa o maltosa a aquélla hace disminuir la concentración de plomo en tejidos duros y blandos significativamente. En la Tabla I se muestra el contenido de plomo en algunos tejidos y la influencia de una dieta con lactosa y maltosa.

TABLA I. *Contenido de Pb en tejidos y la influencia de la dieta*

• **CONTENIDO Pb TEJIDOS (en µg/g)**

Órgano	Conc. Normal	Intox. Pb Inorg.	Intox. Pb Org.
HUESOS	0,67-8,59	☒ 5,6-17,6	7,9
HÍGADO	0,04-0,28	1,8-8	2,3-3,4
RIÑÓN	0,02-0,16	☒ 0,6-5,5	0,79
CEREBRO	0,01-0,09	0,24-1,2	☒ 0,8-1,9

• **INFLUENCIA DIETA**

Tejido	Dieta Pb 20 µg/g	Adición Lactosa	Adición Maltosa
SANGRE	9,8 µg/mL	7,7 µg/mL	7,8 µg/mL
HÍGADO	1,26 µg/g	0,17 µg/g	0,17 µg/g
RIÑÓN	1,01 µg/g	1,4 µg/g	0,9 µg/g
FÉMUR	7,4 µg/g	3,8 µg/g	3,3 µg/g

TOXICOLOGÍA DEL PLOMO

Los efectos tóxicos del plomo dependen en gran medida de su concentración en sangre y del tipo de población, tal como se muestra en la Tabla II. La primera manifestación toxicológica del plomo es un anemia, ya que impide la formación de la hemoglobina, como vemos en la Figura 3. En dosis más elevadas, el plomo da lugar a manifestaciones neurológicas, pudiendo llegar a encefalopatías mortales.

TABLA II. *Efectos tóxicos según su concentración en sangre y tipo de población*

Conc. Sangre	Efectos salud	Población
>40 $\mu\text{g}/\%$	ANEMIA	NIÑOS
>50 $\mu\text{g}/\%$	ANEMIA	ADULTOS
50-60 $\mu\text{g}/\%$	DISFUNCIÓN ENCEFÁLICA	NIÑOS
60-70 $\mu\text{g}/\%$	DISFUNCIÓN ENCEFÁLICA	ADULTOS
60-70 $\mu\text{g}/\%$	ENCEFALOPATÍAS	NIÑOS
>80 $\mu\text{g}/\%$	ENCEFALOPATÍAS	ADULTOS

La toxicidad bioquímica del plomo se manifiesta en el ciclo de formación de la hemoglobina (Figura 3), inhibiendo la actuación de tres enzimas: AAL sintetasa, AAL dehidrasa y hemosinetasa. La consecuencia es la no formación de la hemoglobina, con eliminación de tres metabolitos por orina: AAL, PBG y PPIX, que pueden ser identificados y servir de indicadores de la intoxicación de plomo.

INTOXICACIÓN POR PLOMO

Intoxicaciones agudas

Son muy poco frecuentes. Se producen por ingestión de sales solubles o inhalación de vapores o polvos. Es un cuadro que evoluciona con lentitud, ya que el plomo no es cáustico. Produce vómitos con sialorrea de sabor metálico y dolores de vientre con estreñimiento, para después desarrollar el saturnismo.

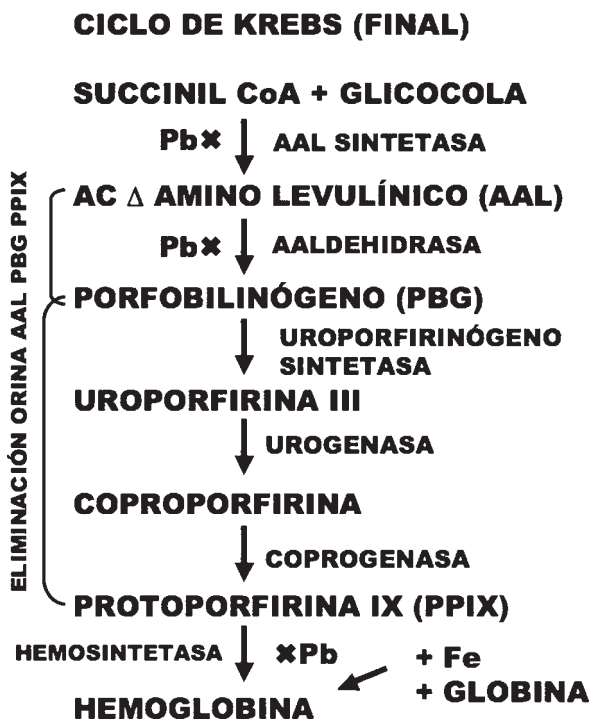


FIGURA 3. *Inhibición del ciclo de formación de la hemoglobina por el plomo.*

Intoxicaciones crónicas de plomo inorgánico (6, 7, 8)

La intoxicación crónica de plomo o saturnismo presenta un cuadro clínico caracterizado por alteraciones orales, con pigmentaciones en las encías; gastrointestinales (cólico saturnino); hematológicas con anemia microcítica; parálisis motora, que afecta principalmente a los miembros y que se recuperan muy lentamente; alteraciones renales, que son muy intensas y con lesiones tubulares por acumulación de plomo en el glomérulo, que actualmente son reversibles y la formación de la pseudogota saturnina con dolores en articulaciones, sólo en casos muy graves. Además, el plomo es abortivo y provoca malformaciones fetales, ya que atraviesa la barrera placentaria.

La encefalopatía saturnina es muy frecuente en la población infantil, provocando una disminución del rendimiento escolar, con

retraso en el proceso de aprendizaje e irritabilidad, llegando a la letargia en casos graves y a episodios convulsivos. En el adulto provoca un cuadro clínico de demencia, parecido a la demencia arteriosclerósica; sensación de fatiga, irritación, trastornos del sueño, cefaleas, alteración en la visión, ataxia y trastornos del habla.

Intoxicaciones de los derivados alquílicos de plomo

El cuadro clínico de una intoxicación por los derivados metílicos y etílicos de Pb(IV) está caracterizado por una anemia y por neuropatías periféricas, afectando al sistema nervioso central, como la encefalopatía saturnina.

Intoxicaciones ocupacionales

Afecta a pintores; trabajadores de fundiciones, de fábricas de baterías; mecánicos, por el empleo de gasolinas como desengrasantes; empleados de gasolineras; guardias urbanos y población infantil por el polvo urbano, constituyendo los patios de los colegios una fuente de absorción masiva de plomo. Hay que prestar especial atención al transporte de plomo en las ropas de los trabajadores, ya que puede afectar a todo el entorno familiar.

EL PLOMO COMO CONTAMINANTE ENERGÉTICO

El plomo que se origina a partir de la combustión de los automóviles se introduce en el ser humano con partículas de igual o menor diámetro de 1 μm en la región interior del pulmón, y una vez en sangre, se distribuye a todos los órganos (Figura 2). Al igual que otros contaminantes, puede viajar a grandes distancias por acción del viento, depositándose en regiones lejanas a su foco de contaminación, lo que le hace ser un contaminante universal.

El control del nivel atmosférico de plomo en las grandes ciudades es tan importante que se le ha fijado como contaminante criterio, llamados así porque fueron objeto de estudios de evaluación publi-

cados en documentos de criterios de evaluación de la calidad del aire. Los niveles urbanos de plomo son de 5 a 50 veces superiores a los de áreas rurales (9).

El método de análisis de referencia para el plomo es el de Absorción Atómica (Real Decreto 717/1987, *B.O.E.* 135, 6/6/1987 y Directiva Europea 30/99).

TRATAMIENTO DE LA INTOXICACIÓN POR PLOMO (10, 11)

La intoxicación de plomo es tratada por la queloterapia, empleando EDTA en dosis de 50 mg/Kg/día, vía venosa o intramuscular, dividido en dos dosis el primer día; el BAL en dosis de 4 mg/Kg cada 4-6 horas, vía intramuscular en 30 dosis, o Penicilamina en dosis de 250 mg/1,7 m³ cada 6-8 horas vía oral, en períodos no superiores a seis meses. Hay que efectuar diuresis previa para evitar neuropatías y complementar con suplementos vitamínicos del complejo B y con hierro.

PREVENCIÓN

Hay que evitar el empleo de plomo en contenedores de alimentos y en la conducción de agua potable; no usar pigmentos exfoliables como pintura de interiores; fomentar las dietas ricas en leche y calcio, que es un antagonista del plomo; controlar por las autoridades el contenido en plomo en alimentos y aguas de bebidas; motivar a los niños el lavado de las manos y que no utilicen juguetes que contengan plomo absorbible y asumir el riesgo que supone la intoxicación crónica de plomo por consumo de carne de caza, ya que los perdigones contienen plomo.

Se deben realizar controles analíticos periódicos en la población expuesta a polvo o humos de plomo. Niveles mayores de 40 µg/mL en sangre exigen la retirada del trabajador del lugar de exposición.

Como medidas preventivas en los trabajadores hay que motivar el lavado de manos, comer fuera del trabajo y el cambio de ropa de trabajo.

Los individuos con perdigones alojados deben someterse a revisiones cada tres meses.

CONCLUSIONES

El plomo tiene una gran presencia en las cadenas tróficas, siendo la fuente natural su principal aporte.

El ser humano ha estado en contacto con el plomo desde tiempos remotos, y por ello ha elaborado un control homeostático, almacenado principalmente al plomo en los huesos. Esta retirada del plomo plasmático, para ser incorporado a la hidroxiapatita, puede resultar peligrosa, ya que en caso de un déficit de calcio se rompe la estructura del mineral para verter calcio a plasma, pero también sale plomo y otros metales que han sustituido isomórficamente al calcio, con riesgo de intoxicación aguda.

El plomo, como tóxico ocupacional, afecta a diferentes profesiones, como pintores, impresores, trabajadores de fábricas (especialmente de baterías), mineros, etc., y produce enfermedades profesionales que afectan a la calidad de vida, debiendo prestar especial atención a las trabajadoras embarazadas por sus efectos abortivos.

El plomo es también un tóxico doméstico, ya que está presente en pinturas, barnices, esmaltes, vidrios, red de conducción del agua potable, polvo doméstico, etc., por lo que se tendrá que poner especial cuidado con la población infantil.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BRUCE KING, R. (1997): Encyclopedia of Inorganic Chemistry. Ed. John Wiley and Sons. Sussex.
- (2) Properties of Inorganic Compounds (1997): CRC Press.
- (3) DALLY, S.; DUVELLEROY, M.; CONSO, F. and FOURNIER, E. (1980): Simulation d'intoxications chroniques: l'exemple du plomb. *Archives des maladies professionnelles*. 41: 129.
- (4) AUFDERHIDE, A. C. and WITTMERS, L. E. (1992): Selected aspects of the special distribution of lead in bone. *Neurotoxicology*. 13: 809.
- (5) RABINOWITZ, M. B.; WETHERILL, G. W. and KOPPLE, J. D. (1976): Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J. Clin. Invest.* 58: 260.

- (6) STRASIMIROVA, R.; IVANOVA, S.; PETKOVA, V.; METAKIEVA, M.; DICEVA, C. and CEPILOV, I. (1977): Kam uvrezdanijata na stomasno-crevnija trakt u rabotetite v kontakt s olovo. *Higiena I zdraveopazvane*. 20: 224.
- (7) ALBAHARY, C. (1985): L'erythropathie saturnine chronique. *Nouvelle presse medicale*. 58: 470.
- (8) YULE, W. (1992): Review neurotoxicity of lead. *Child Care Health Dev*. 18: 321.
- (9) <http://www.mambiente.munimadrid.es/contamiweb.html>.
- (10) O'CONNOR, M. E. (1992): CaEDTA vs CaEDTA plus BAL to treat children with elevated blood lead levels. *Clin. Pediatr*. 31: 386.
- (11) WEGMANN, K. V. (1992): Chelation therapy to treat lead toxicity in children. *Min. Med*. 75: 25.

Factores estructurales, bioquímicos y moleculares de la simbiosis *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)-*Lupinus*

Recibido el 11 de septiembre de 2006

M. R. DE FELIPE ANTÓN¹, M. FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. M. LUCAS SÁNCHEZ, E. FEDOROVA*, M. P. GOLVANO HERRERO*, A. GONZÁLEZ SAMA*, L. GUASCH PEREIRA*, C. DE LORENZO CARRETERO*, N. DE MARÍA DE LA HERAS*, J. M. POZUELO GUANCHE*, J. J. PUEYO DABAD*, A. VIVO RODRÍGUEZ*

* Autores en orden alfabético.

Instituto de Recursos Naturales. Centro de Ciencias Medioambientales del C.S.I.C. Madrid

RESUMEN

La presente revisión es un resumen de algunos trabajos originales realizados en nuestro Departamento para el estudio de diferentes aspectos de esta peculiar simbiosis, siempre integrando estructura y función. La primera parte está dedicada a un estudio estructural llevado a cabo con el fin de conocer los mecanismos de infección, que difieren de la mayoría de las leguminosas estudiadas. Para este fin se aplicaron técnicas de inmunofluorescencia con la *green fluorescent protein* (GFP), técnicas de inmunocitoquímica y de hibridación *in situ*. Mediante estos estudios se ha observado que la infección se realiza por vía intercelular. Junto al estudio estructural se describen algunos componentes enzimáticos del nódulo, MAPKinasas (Mitogen-activated protein kinase) y aldehído oxidasa, presentes en estadios tempranos del reconocimiento bacteria-planta. Ambos enzimas están relacionados con la mitosis y la multiplicación de las células radicales.

¹ Email de contacto: mr.defelipe@hotmail.com

La segunda parte se refiere a los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que regulan la simbiosis, especialmente los relacionados con la regulación de oxígeno en el nódulo, de gran importancia para la fijación de N_2 , ya que la nitrógenasa necesita una atmósfera microaeróbica para fijar nitrógeno. Se describen algunos mecanismos de regulación, como la leghemoglobina y la barrera de resistencia a la difusión de O_2 . Por último también se incluye el estudio genético que realizamos para conocer los genes que regulan la difusión de O_2 en el nódulo: *lenod 2*, *leghemoglobin* y *nifH*.

Palabras clave: Aldehído oxidasa.—Barrera de resistencia a la difusión de oxígeno.—Fijación biológica de nitrógeno.—Leghemoglobina.—Lupino.—MAPKinasas.—Proceso de infección.—Regulación de oxígeno.

SUMMARY

Structural, biochemical and molecular factors of the symbiosis *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)-*Lupinus*

The present revision summarises some of the original works carried out in our Department to study different aspects of the peculiar symbiosis *Bradyrhizobium* sp. *Lupinus*, by integrating structure and function. The first part of the revision is focused to a structural study on the infection mechanisms, since differ of other legumes. This study was realized by applying immunofluorescent techniques with the *green fluorescent protein*, immunocytochemistry and different microscopies. It could be observed that the infection by the *Bradyrhizobium* follows the intercellular way. The infection study includes the presence of enzymatic components, as MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) and aldehyde oxidase in the first steps of the symbiosis. Both enzymes are very much related with auxins and cell multiplication.

The second part takes up the physiological, biochemical and genetic mechanisms that regulates nitrogen fixation, specially those related to oxygen diffusion, since nitrogenase activity is very sensible to oxygen and needs a microaerobic atmosphere for its function. Between these mechanisms, the leghemoglobine and the oxygen-diffusion resistance barrier have been considered the more important in oxygen regulation. Finally it is included the results of a genetic study carried out to know the genes implicated in nodule oxygen diffusion as: *lenod 2*, *leghemoglobin* and *nifH*.

Key words: Aldehyde oxidase.—Biological nitrogen fixation.—Infection process.—Leghemoglobin.—Lupin plants.—MAPKinases.—Oxygen regulation.—Oxygen diffusion barrier.

1. INTRODUCCIÓN: FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) aporta la mayor parte del nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres. Se estima que apro-

ximadamente 100 especies de leguminosas agrícola-mente importantes contribuyen anualmente con casi la mitad del nitrógeno fijado biológicamente. La FBN representa una alternativa a la fertilización nitrogenada y está restringida a organismos procariontes, capaces de reducir el nitrógeno molecular a amoníaco, tanto en vida libre como en simbiosis. Este proceso que hermana a las leguminosas con las bacterias, estableciendo un diálogo entre los dos simbioses, constituye una de las biotecnologías más sorprendentes y excepcionales, por su gran repercusión en los sectores sanitario, agroalimentario y ecológico.

El enzima responsable de la fijación de nitrógeno, la nitrogenasa, que reduce el nitrógeno atmosférico a amonio, es muy sensible al oxígeno. Algunos autores opinan que la simbiosis entre las leguminosas y las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* existía ya antes de que el oxígeno existiera en la tierra y ésta puede ser la causa de las condiciones de anaerobiosis, que requiere este proceso.

Desde 1985 nuestro grupo de investigación viene trabajando en Fijación Biológica de Nitrógeno, concretamente en la simbiosis *Bradyrhizobium*-sp. (*Lupinus*)-*Lupinus*, que tiene características propias que la diferencian de otras simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

2. EL LUPINO (*LUPINUS*)

El lupino o altramuz (Figura 1) es una de las leguminosas de mayor interés ecológico y agronómico, por ser una de las que más N fija en el suelo, repercutiendo muy positivamente sobre la agricultura y el medio ambiente, constituyendo una de las mayores promesas de la agricultura sostenible. En trabajos anteriores se ha demostrado que esta simbiosis es especialmente sensible a estreses abióticos como nitrato (1), salinidad (2) y determinados herbicidas (3, 4). Su capacidad de crecer en suelos contaminados con metales pesados permite considerarla como una potencial planta fitorremediadora (5, 6).

Las especies del género *Lupinus* establecen simbiosis con bacterias del género *Bradyrhizobium*, bacteria de crecimiento lento, en la cual sólo hay una especie definida: *Bradyrhizobium japonicum*. El resto de las especies se nombran con el nombre del género seguido

de la especie de leguminosa que nodulan. En el caso de *Lupinus: Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*).

El nódulo de lupino, aunque de carácter indeterminado, presenta características propias, constituyendo el tipo denominado lupinoide (Figura 2). Sus características estructurales han sido ampliamente estudiadas por nuestro grupo de investigación (7).



FIGURA 1. *Planta de Lupinus albus* cv. *Multolupa* en floración. Finca La Higuera, Santa Olalla. Toledo.

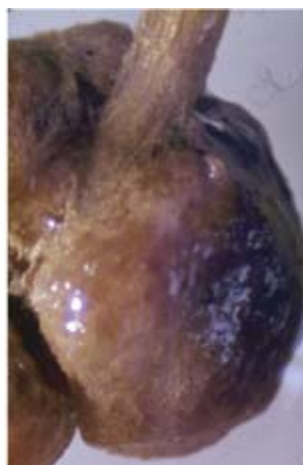


FIGURA 2. *Nódulos de Lupinus albus*.

2.1. Factores estructurales:

Proceso de infección *Bradyrhizobium-Lupinus*

El proceso tiene características propias, desconocidas hasta estudios recientes realizados por el Doctor González Sama en su Tesis Doctoral (8). Mediante la combinación de diferentes microscopías y técnicas relacionadas, como microscopía de fluorescencia, láser confocal, microscopía electrónica de transmisión y barrido y técnicas de inmunomarcado de bacterias especialmente con la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*), se ha observado que se trata de un proceso de infección peculiar diferente al resto de las leguminosas, que exponemos a continuación:

2.1.1. Colonización e infección de las células corticales por *Bradyrhizobium*

Las raíces de *Lupinus* excretan sustancias de tipo flavonoide que atraen al *Bradyrhizobium* a la rizosfera, adhiriéndose a la superficie externa de los pelos radicales. Unos días después de la inoculación, las bacterias se encuentran inmersas en una masa mucilaginosa rica en glicoproteínas excretadas por las raíces, identificadas por el anticuerpo monoclonal MAC 265 (9). A continuación los rizobios proliferan en la zona de contacto entre los pelos radicales y las células epidérmicas, donde tendrá lugar la entrada de las bacterias a las células corticales de la raíz. La infección se realiza por vía intercelular y la invasión ocurre de manera localizada en una única célula situada bajo un pelo radical (Figura 3). Las primeras divisiones de las células de la corteza externa tienen lugar a continuación. La invasión de la célula cortical localizada debajo del pelo radical se produce a través de regiones de la pared celular alteradas estructuralmente (Figura 3B). No se han observado canales de infección.

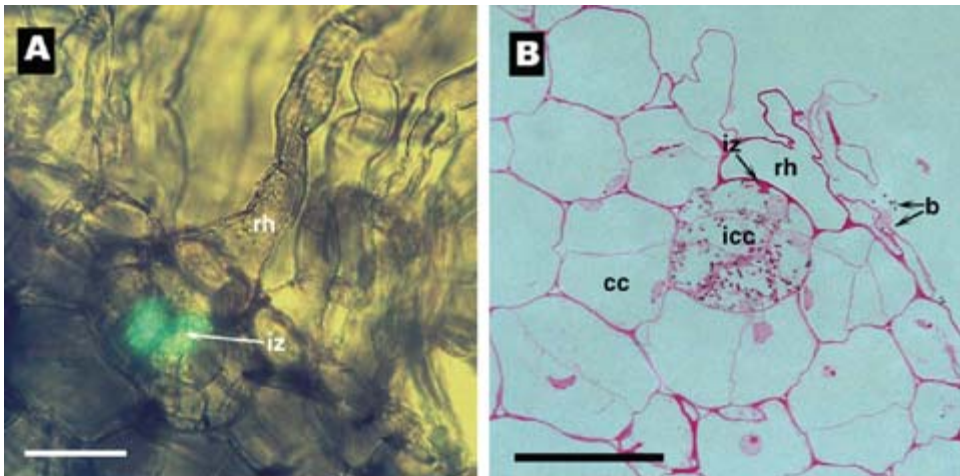


FIGURA 3. *Infección e inicio de la nodulación en raíces de Lupinus albus, seis días después de la inoculación.* **A)** Microfografía de fluorescencia mostrando el inicio de la infección por *Mesorhizobium loti* marcado con GFP, en célula bajo el pelo radical. **B)** Microfografía en campo claro mostrando el primordio nodular con células corticales y células infectadas (bacterias inmunomarcadas en negro) en división; b, bacterias; cc, células corticales; icc, células infectadas; iz, zona de infección; rh, pelo radical. Barra: A, 100 μm ; B, 20 μm .

2.1.2. *Formación del primordio nodular*

La célula cortical infectada se divide repetidamente dando varias células hijas, donde se distribuyen las bacterias (Figura 3B). Las células de alrededor no infectadas se dividen simultáneamente. En una fase más avanzada el primordio nodular presenta dos zonas claramente diferenciadas: zona central, que dará lugar a la zona infectada del nódulo y contiene únicamente células infectadas en diferentes estadios de división y zona cortical, que presenta células no infectadas en división que darán lugar a la corteza del nódulo. Ambas zonas constituyen el nódulo de lupino. En cada ciclo de división se produce una reorganización intracelular de los rizobios y un reparto aparentemente equitativo entre las células hijas. Los rizobios se sitúan de manera que no interfieran en la división celular (8, 9).

La división de las células infectadas constituye una originalidad del nódulo de lupino que le diferencia de la mayoría de los nódulos estudiados. En las etapas tempranas del desarrollo, el nódulo crece en todas direcciones adquiriendo una forma esférica, que recuerda a los nódulos determinados. Conforme el nódulo madura, la zona meristemática queda circunscrita a la región basal-lateral y el nódulo continúa creciendo, pudiendo rodear completamente a la raíz, momento en que cesa su desarrollo (Figura 2).

2.1.3. *Activación de MAPKs en la infección *Bradyrhizobium* sp *Lupinus**

En el proceso de reconocimiento entre los dos simbioses intervienen señales relacionadas con el ciclo celular, ya que inmediatamente se iniciará una multiplicación celular en la corteza de la raíz para alojar al *Bradyrhizobium*. Las MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) están implicadas en la regulación del ciclo celular, en la acción hormonal (auxinas) y en la respuesta de la planta a diversos estreses y patógenos.

Nuestros estudios han constatado que las MAPKs pueden mediar en los procesos de infección por rizobios. La inoculación de *L. albus* con *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) activa transitoriamente SIMK (Salt stress-inducible MAPK) y SAMK (stress-activated MAPK). La inocu-

lación de raíces con bacterias muertas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) o con *Sinorhizobium meliloti*, bacteria incapaz de nodular *Lupinus*, no tiene efecto en la activación de SIMK y SAMK (10).

Estos datos indican que la activación de estos enzimas es una respuesta específica de las células de la leguminosa a la presencia de una bacteria potencialmente simbiótica, y por tanto puede conducir a una interacción simbiótica positiva. La utilización de inhibidores específicos de MAPKs produce un retraso en la nodulación, lo que sugiere que estas quinasas intervienen en procesos tempranos de la infección.

2.1.4. Presencia de aldehído oxidasa en el primordio nodular

Las auxinas (fitohormonas) actúan en la organogénesis de los nódulos de leguminosas, aunque su papel no es totalmente conocido. Sin embargo, recientemente hemos demostrado, por primera vez, la presencia de un enzima de la síntesis de ácido indol acético (AIA) en nódulos, y por tanto la potencial capacidad de síntesis de esta hormona. El enzima aldehído oxidasa (AO) interviene en la última etapa de la síntesis del ácido abscísico (ABA) y del ácido indol acético (AIA) vía indol-3-pirúvico.

Los nódulos de *L. albus*, inducidos por cepas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), poseen tres isoenzimas de AO. Sin embargo, los nódulos Fix^- , de crecimiento restringido y senescencia prematura, inducidos por una cepa de *Mesorhizobium loti*, no parecen poseer AOs activas. Mediante el inmunomarcado de los tejidos con anticuerpos que reconocen AOs nodulares, se estudió la localización del enzima, por microscopía electrónica de transmisión, de fluorescencia y microscopía láser confocal. La proteína, que es citoplasmática, se localiza preferentemente en la zona meristemática lateral de los nódulos de altramuz (11), constituida por células no infectadas e infectadas en división (Figura 4). El análisis de expresión de AO mediante RT-PCR demostró que la expresión más alta se produce en el primordio nodular y la más baja en nódulos Fix^- . Los estudios de hibridación *in situ* mostraron un patrón de expresión altamente consistente con la distribución de la proteína. Además el patrón de inmunolocalización de AIA fue semejante al encontrado para AO.

Por el contrario, el inmunomarcado de ABA en los nódulos reveló que los niveles de esta hormona eran bajos y homogéneos en todas las zonas del nódulo. Estos resultados indican la capacidad de síntesis local de AIA en la zona meristemática del nódulo de altramu, así como la posible implicación de AO en la organogénesis nodular y en la autorregulación del crecimiento y el desarrollo de los nódulos.

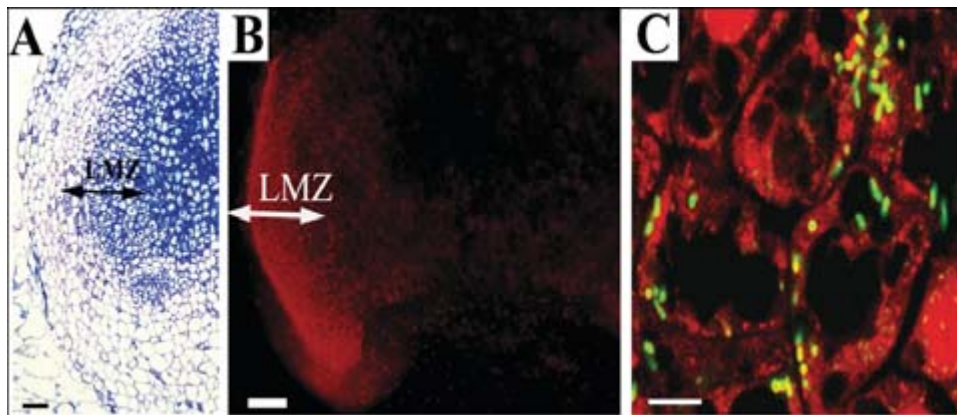


FIGURA 4. **Localización de aldehído oxidasa.** A) Fotografía de campo claro mostrando zona meristemática lateral (LMZ). B) Imagen de microscopía láser confocal de localización de aldehído oxidasa, en LMZ. C) Detalle de B, mostrando localización de aldehído oxidasa en células infectadas con bacterias con fluorescencia en verde. Barra: A y B, 100 μm ; C, 10 μm .

2.1.5. Estructura del nódulo de lupino

La Figura 5 muestra un nódulo de lupino al microscopio óptico (7). Está formado por una corteza externa (CE) de células alargadas más o menos isodiamétricas, una corteza media (CM) de células irregulares de mayor tamaño y de paredes engrosadas, una corteza interna (CI) y una zona central que corresponde a la zona infectada (ZI). Los haces vasculares por los que se comunica el nódulo con la raíz se sitúan en la corteza interna. La zona central está formada por células infectadas únicamente. En las células infectadas, las bacterias se transforman en bacteroides, rodeándose de una membrana de origen vegetal, la llamada membrana peribacteroidal. La unidad fijadora de nitrógeno o *simbiosoma*, está constituida por uno o más bacteroides separados del citosol por la membrana peribacteroidal.

Junto a los bacteroides se encuentran orgánulos subcelulares como amiloplastos, mitocondrias y peroxisomas. A su vez los bacteroides observados al microscopio electrónico son de tipo multiforme, contienen reservas de polihidroxy butirato y polifosfato. Pero su principal característica es su capacidad para fijar nitrógeno, gracias a que poseen el enzima nitrogenasa que transforma el nitrógeno atmosférico en amoníaco y posteriormente por acción de los enzimas glutamino sintetasa (GS), glutamato glutamina 2-oxiglutarato amino transferas (GOGAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH), el amoníaco se transforma en aminoácidos y éstos en amidas que son transportadas a la parte aérea de la planta.

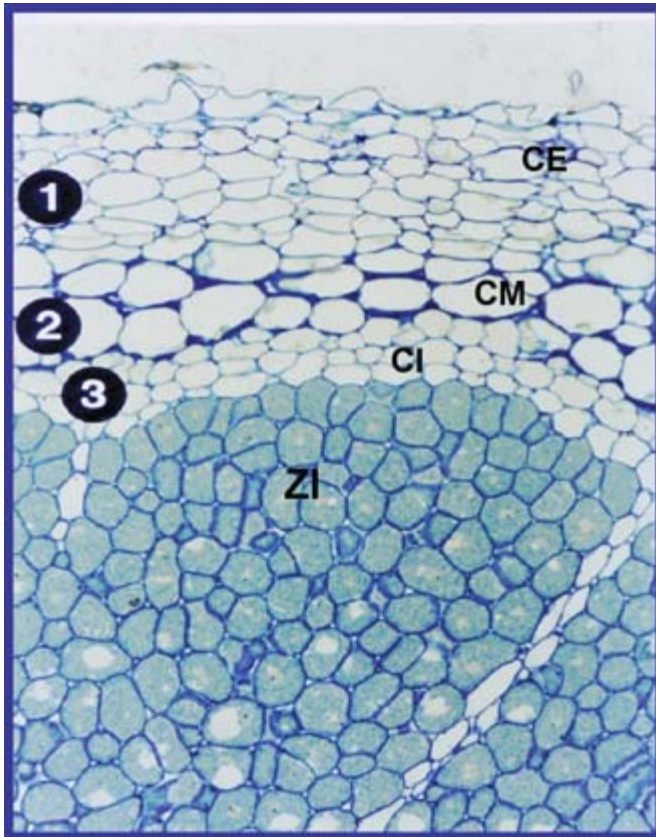


FIGURA 5. *Estructura del nódulo de Lupinus albus* incluido en LR white y teñido con toluidina. ZI, zona infectada; CI (1), Corteza interna; CM (2), Corteza media; CE (3), Corteza externa.

3. FACTORES FISIOLÓGICOS BIOQUÍMICOS Y GENÉTICOS DE LA SIMBIOSIS *BRADYRHIZOBIUM-LUPINUS*

3.1. Regulación de la concentración de oxígeno en los nódulos

El enzima nitrogenasa, responsable de la fijación de nitrógeno, es inactivada por el oxígeno. La concentración de oxígeno debe estar limitada en el interior del nódulo, para lo cual la planta cuenta con varios mecanismos de regulación.

3.1.1. *Leghemoglobina (Lh) (hemoglobina de las plantas)*

La leghemoglobina es la proteína mayoritaria del nódulo, cuya función es transportar oxígeno a los bacteroides, transformada en oxileghemoglobina. Se cree que a su síntesis contribuyen ambos simbiosites, bacteria y planta, y aparece cuando el nódulo está formado morfológicamente. Se la denomina *nodulina tardía* por expresarse después del desarrollo morfológico del nódulo. Su presencia es imprescindible para que la fijación de nitrógeno pueda realizarse. Para cumplir esta función el Fe del grupo hemo debe estar en forma reducida (Fe^{2+}), existiendo reductasas en el nódulo para controlar la oxidación.

Por el importante papel que juega esta proteína, su localización fue motivo de estudio por diversos laboratorios, siendo los resultados muy diferentes y contradictorios mediante técnicas bioquímicas. Nuestro grupo abordó la localización inmuocitoquímica de la Lh.

3.1.2. *Localización de la Lh por técnicas inmunocitoquímicas*

La proteína se extrajo a partir del extracto de nódulos de lupino y una vez purificada se obtuvieron los anticuerpos policlonales, haciendo una caracterización posterior de las inmunoglobulinas. Se obtuvo un anticuerpo primario con un título muy alto, de gran especificidad. La localización se realizó con un anticuerpo secundario cabra-anticonejo, unido a oro coloidal (12).

La Figura 6 muestra la localización de Lh en las células infectadas. En la figura se muestra la localización en el citosol y en la membrana peribacteroidal (PBM) de los bacteroides de *Bradyrhizobium*. Estos resultados contradecían resultados anteriores sobre la localización de la Lh en el espacio peribacteroidal (PBS).

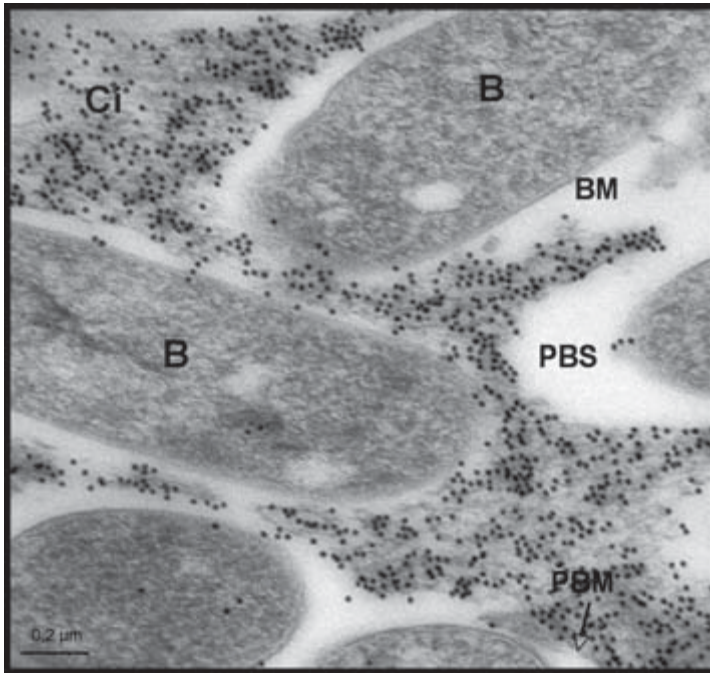


FIGURA 6. **Localización de leghemoglobina.** Sección ultrafina de células infectadas inmunomarcada con anti-leghemoglobina de lupino. B, bacteroid; Ci, citosol; PBM, membrana peribacteroidal, PBS, espacio peribacteroidal.

La localización *in situ* de la Lh representó un importante descubrimiento para conocer la regulación de oxígeno en el nódulo. El oxígeno transportado desde la superficie del nódulo a través de los espacios intercelulares de la corteza, llega a la zona infectada y en la interfase corteza/zona infectada es atrapado por la leghemoglobina que transformada en oxileghemoglobina, libera el oxígeno paulatinamente a los bacteroides, desde la membrana peribacteroidal a la membrana bacteroidal (BM), donde se encuentra la cadena respiratoria.

3.1.3. *Ultraestructura del simbiosoma*

El hecho de no existir leghemoglobina en el espacio peribacteroidal (PBS), conducía a la hipótesis de la existencia de un transportador enzimático, un transportador de oxígeno en el espacio peribacteroidal, que transportara el oxígeno desde la PBM a la BM. También nos planteamos que el PBS fuera un artefacto, observado por técnicas convencionales. Por lo que era de interés estudiar la estructura del simbiosoma por técnicas que pusieran de relieve su estructura real.

La técnica «High Pressure Freezing» (HPF) cumple este requisito, permite la preservación de los tejidos y es el único método hasta el momento actual, capaz de crioinmovilizar hasta 500 μm de tejido en estado nativo (13). Nuestro objetivo fue comparar la estructura de nódulos de *Lupinus albus* observada por procesamiento convencional con la obtenida por HPF.

Los resultados obtenidos mostraron claramente que la membrana peribacteroidal está en estrecho contacto con la membrana bacteroidal (Figura 7), dejando un espacio peribacteroidal muy reducido entre ambas membranas (14). El estrecho espacio peribacteroidal aparece como una matriz densa a los electrones, lo que está de acuerdo con la posible existencia de enzimas y proteínas en este pequeño espacio (15).

El O_2 es liberado por la leghemoglobina, desde la membrana peribacteroidal directamente a la membrana bacteroidal y a los bacteroides. Un estrecho intercambio de nutrientes y metabolitos entre ambos simbiosomas, planta y bacteria, puede tener lugar con normalidad entre ambas membranas.

La técnica HPF constituye la técnica apropiada para estudiar aspectos funcionales en el desarrollo de los nódulos como el proceso de formación del simbiosoma, y a profundizar desde su origen en la relación estructura-función de este orgánulo subcelular, existente únicamente en leguminosas.

3.1.4. Barrera de resistencia a la difusión de oxígeno

Constituye otro de los mecanismos de regulación de oxígeno en los nódulos de leguminosas (7). El uso de un microelectrodo de oxígeno para seguir su concentración desde la superficie al interior del nódulo, da como resultado una disminución drástica a partir de la corteza media, lo que parece indicar que esta estructura regula el acceso de O_2 a la zona central del nódulo donde se encuentran los bacteroides.

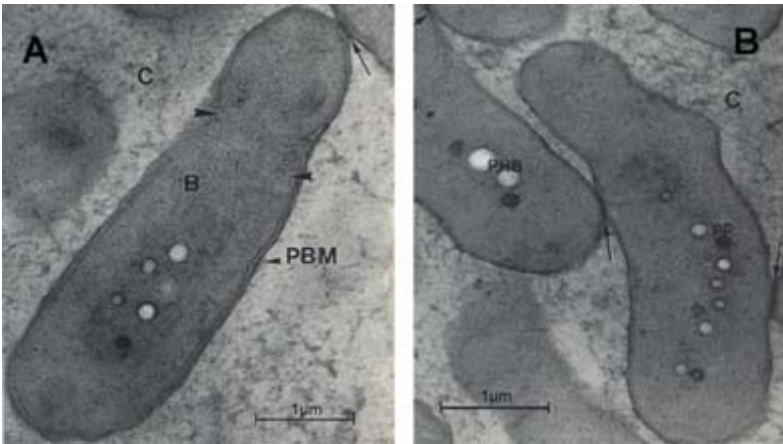


FIGURA 7. **Microfotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de nódulos de *Lupinus albus* tratados con HPF.** A) Detalle de bacteroides mostrando la membrana peribacteroidal estrechamente unida al bacterioide. B) Puntos de contacto entre bacteroides. B, bacteroids; C, citosol; PBM, membrana peribacteroidal; PBS, espacio peribacteroidal; PHB, polihidroxibutirato; PP, polifosfato.

La corteza media del nódulo de *Lupinus albus* (Figura 8) está formada por dos o tres capas de células de mayor tamaño que las de la corteza externa e interna, con grandes espacios intercelulares y paredes engrosadas. La tinción con Ácido periódico-Base de Schiff, usada rutinariamente para la localización de hidratos de carbono, muestra una tinción intensa de las paredes celulares de la corteza media y de la matriz de los espacios intercelulares, lo que indica su constitución hidrocarbonada.

Con el fin de conocer exactamente la naturaleza hidrocarbonada de la matriz de los espacios intercelulares, aplicamos técnicas inmu-

nocitoquímicas con los anticuerpos monoclonales MAC 265 y MAC 236, que habían localizado *in situ* una glicoproteína de guisante en los canales y gotas de infección (16).

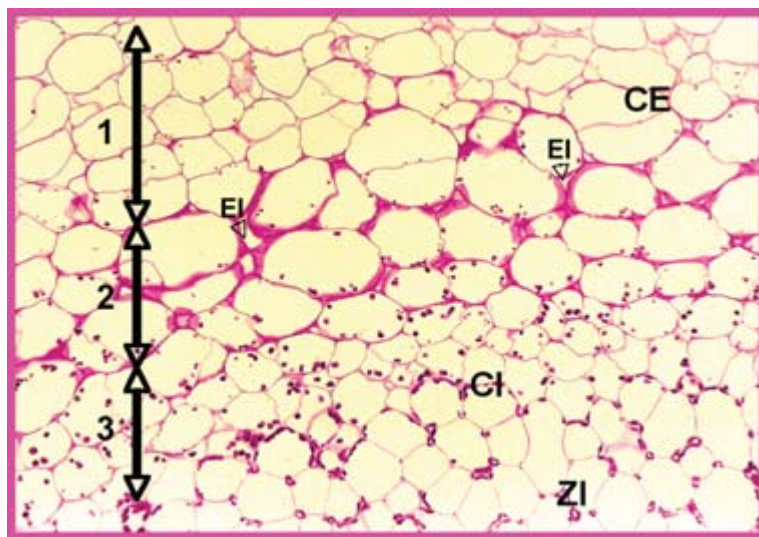


FIGURA 8. Zona de la corteza nódulo de *Lupinus albus* mostrando la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno. Sección radial. CE, corteza externa (1), Corteza media (2). X 300, Corteza interna (3). EI, espacio intercelular; ZI, zona infectada.

También ambos anticuerpos habían reaccionado con una única banda de 95 kDa en extractos solubles de guisante mediante electroforesis desnaturizante e inmunoblotting, obteniendo los mismos resultados en extractos de judía y soja (16) y en especies de los géneros *Vicia* y *Lathyrus* (17). Sin embargo en extractos de *Lupinus albus* el anticuerpo MAC 236 reconoció una banda de 240 kDa, mientras que el MAC 265 reconoció una única banda de 135 kDa (1, 18). Los resultados sugirieron que en lupino los dos epítomos pueden pertenecer a dos glicoproteínas estrechamente relacionadas, pero con funciones diferentes. Nuestro objetivo se centró en determinar estas funciones en la regulación de oxígeno y en su localización en la corteza media del nódulo.

La Figura 9 muestra la localización del antígeno MAC 236 en los espacios intercelulares de las células de la corteza media del nódulo

de lupino mediante microscopía óptica y electrónica. Para conocer el comportamiento de la corteza media como posible barrera de resistencia a la difusión de oxígeno, comparamos la localización inmunocitoquímica en plantas crecidas en condiciones normales y en presencia de nitrato. La localización fue mayor en el último caso, lo que parece indicar que la glicoproteína está relacionada íntimamente con la operación de la barrera aumentando o disminuyendo su contenido y en consecuencia abriendo o cerrando el flujo de oxígeno a la zona infectada.

En condiciones de estrés (nitrato, oscuridad, salinidad, etc.) las glicoproteínas aumentan en los espacios intercelulares, cerrando la posibilidad al oxígeno de difundir a la zona infectada (3, 18). De este modo, la barrera es capaz de ajustar la resistencia a la difusión de O_2 , de acuerdo a las condiciones ambientales de crecimiento de las plantas.

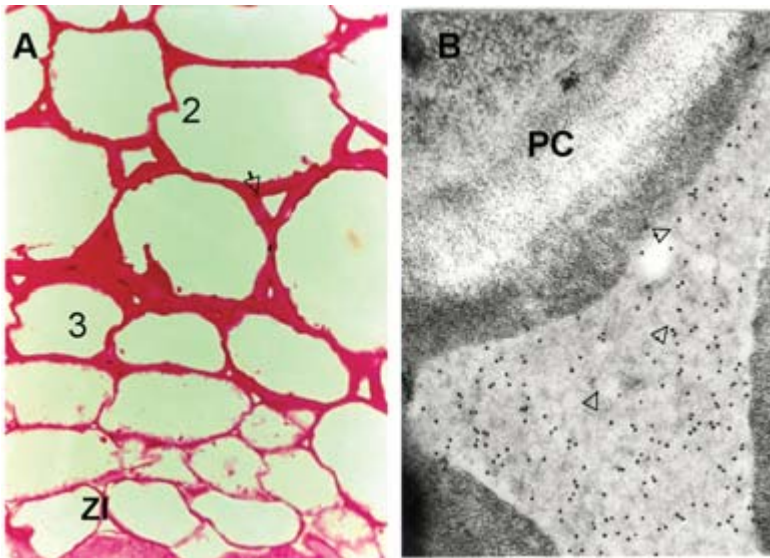


FIGURA 9. **Inmunolocalización de la glicoproteína** reconocida por el anticuerpo monoclonal MAC 236 en nódulos de altramuz al microscopio óptico (A) y electrónico (B). A) Corteza externa (1), corteza media (2) y corteza interna (3). x 200. B) Espacio intercelular de zona 2. x 43.900. CI, células infectadas; PC, pared celular.

Los trabajos llevados a cabo para el estudio de la identificación y operación de la barrera de resistencia a la difusión de O₂ han sido realizados en colaboración con el Doctor Frank Minchin (Aberystwyth, País de Gales, U.K.). De los dos epítomos estudiados, MAC 236 y MAC 265, el primero parece estar relacionado con el desarrollo del nódulo y situaciones de estrés de la planta, de ahí su papel en el funcionamiento de la barrera de difusión de oxígeno, regulando su concentración en la zona infectada. Por el contrario, el epítomo MAC 265, apenas se encuentra localizado en la matriz intercelular y creemos que está principalmente asociado a los primeros estadios de la infección del *Bradyrhizobium* (19) y su concentración no cambia con la edad de la planta.

Así pues, en esta simbiosis las glicoproteínas parecen tener un papel relevante en las primeras etapas de interacción entre los dos simbioses. También este estudio nos ha permitido observar estructuras nodulares (1), que se encuentran adheridas a las paredes celulares de los espacios intercelulares de las células de la barrera morfológica, conteniendo también glicoproteínas y que pudieran actuar como reservorios a lo largo del desarrollo del nódulo.

3.1.5. *Expresión de genes implicados en la regulación de oxígeno*

Para constatar estructuralmente si la limitación de oxígeno en el nódulo es la causa principal de la inhibición de la fijación de nitrógeno, aplicamos diferentes concentraciones de oxígeno por debajo y por encima de la presión atmosférica: 1% y 40% de oxígeno (20, 21). Este estudio fue complementado con la expresión de los genes relacionados con la difusión de O₂: *enod2*, *leghemoglobina* y *nifH*, dado el desconocimiento de las bases moleculares de la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno.

La expresión del gen *enod 2* en nódulos de lupino (*lenod 2*) fue llevada a cabo en colaboración con el Doctor Bisseling (Universidad de Wageningen, Holanda). La aplicación de técnicas de Northern Blot e Hibridación *in situ* con la sonda de un fragmento de *lenod 2* de *Lupinus luteus*, cedida por el Doctor Legocki de la Universidad de Poznan (Polonia), sirvieron para demostrar la influencia del oxígeno en la expresión del gen (20). Para la hibridación la sonda fue mar-

cada con digoxigenina y para la detección se aplicaron anticuerpos antidigoxigenina unidos a fosfatasa alcalina o bien sonda marcada radiactivamente.

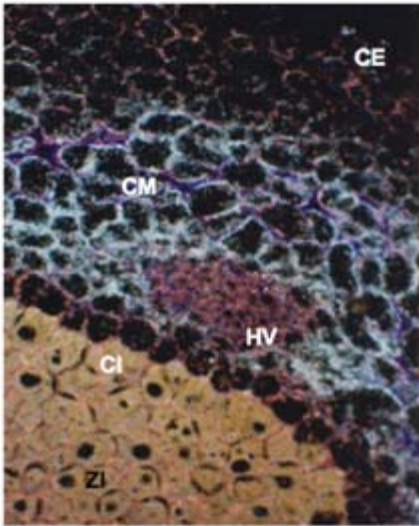


FIGURA 10. **Hibridación in situ (RNA-RNA)** con sonda de *lenod 2* marcada con S^{35} y revelada con emulsión fotográfica. Nódulos incluidos en Paraplast. ZI, zona infectada.

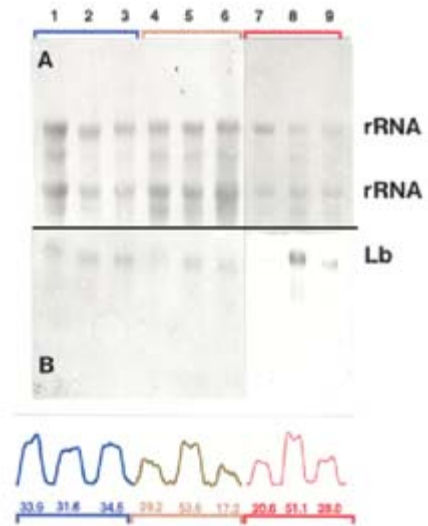


FIGURA 11. **Expresión de la leghemoglobina de lupino mediante Northern-blot.** A) Tinción del RNA total con Azul de Metileno.

B) Hibridación de la misma membrana con la sonda de LbI marcada con Digoxigenina. Revelado con anticuerpos unidos a fosfatasa alcalina. 1) 1% O_2 1 día. 2) 21% O_2 1 día. 3) 40% O_2 1 día. 4) 1% O_2 3 días. 5) 21% O_2 3 días. 6) 40% O_2 3 días. 7) 1% O_2 10 días. 8) 21% O_2 10 días. 9) 40% O_2 10 días. 10 mg de RNA total. Se incluye el perfil densitométrico de los inmunoblots.

La Figura 10 muestra la localización del gen *lenod 2* usando sonda radioactiva y digoxigenina, respectivamente, en una sección longitudinal del nódulo de lupino. Como puede observarse, la localización coincide con el parénquima o corteza media donde se sitúa la barrera de resistencia al O_2 . La localización es muy específica, no en-

contrándose en otras estructuras del nódulo y varía con la concentración de oxígeno aplicada. Estos resultados apuntan a que el gen *lenod 2* podría estar implicado en la formación de la barrera morfológica de resistencia a la difusión de O_2 (20).

La expresión de *lenod 2* comienza a detectarse trece días después de la inoculación, antes de la aparición de la nitrogenasa, por lo que puede considerarse como nodulina temprana. Con respecto a la expresión de genes implicados en la regulación de la difusión de O_2 , el notable incremento del contenido del mensajero del gen *enod 2* con la aplicación de 40% O_2 al sistema radicular durante tres días coincide con el aumento de la resistencia mínima, lo que parece confirmar su papel en la difusión de oxígeno a medio plazo, mientras que a más largo plazo los cambios bioquímicos y genéticos ceden el protagonismo a los estructurales. El mensajero de leghemoglobina desciende de forma apreciable a partir del tercer día de aplicación de oxígeno (Figura 11), lo que está en concordancia con el papel regulador de la misma en el bloqueo de la difusión facilitada. Mientras que la expresión de *nifH*, perteneciente al simbionte, no se ve alterada por los tratamientos aplicados. Esto demuestra la capacidad de adaptación de los nódulos de lupino a altas concentraciones de O_2 , debido a la sucesión de modificaciones fisiológicas, bioquímicas y estructurales producidas en los mecanismos de difusión de O_2 dentro del nódulo.

4. CONSIDERACIONES FINALES

A pesar de los estudios científicos realizados, dirigidos a paliar el hambre que padece gran parte de la población mundial, sin embargo poco se ha conseguido para cambiar esta triste realidad. Cerca de 190 millones de personas, un tercio de la población de África, son susceptibles de carecer definitivamente de alimentos. En la presente revisión hemos pretendido resaltar el interés de las interacciones planta microorganismo, como alternativa al uso de fertilizantes químicos, demasiado costosos para los pequeños agricultores de países en desarrollo. Estas biotecnologías constituyen una alternativa al uso de agroquímicos y fitosanitarios y convenientemente aplicadas pueden repercutir en la mejor calidad de las cosechas y en el aumento de la productividad.

En este sentido el reto de extender la simbiosis a plantas no leguminosas, como maíz y arroz, cultivos básicos en países subdesarrollados que dependen únicamente de estos monocultivos, parece en la actualidad difícil de conseguir. Para ello es preciso un conocimiento más profundo de las interacciones planta microorganismo, y especialmente exige un estudio minucioso de las características fisiológicas y genéticas de la planta permitiendo la entrada de la bacteria. Nuestro interés en seguir estudiando la simbiosis *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)-*Lupinus* tiene este objetivo, ya que al tratarse de una simbiosis muy particular, que no sigue el patrón general de las leguminosas, podría ayudar a conocer cómo se pueden establecer simbiosis en plantas alejadas de las leguminosas, como los cereales.

5. BIBLIOGRAFÍA

- (1) DE LORENZO, C.; IANNETTA, P. P. M.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; JAMES, E. K.; LUCAS, M. M.; SPRENT, J. I.; WITTY, J. F.; MINCHIN, F. R. and DE FELIPE, M. R. (1993): Oxygen diffusion in lupin nodules. II. Mechanisms of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.* 44: 1469-1474.
- (2) FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; DE LORENZO, C.; DE FELIPE, M. R.; RAJALAKSHMI, S.; GORDON, A. J.; THOMAS, B. J. and MINCHIN, F. R. (1996): Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. *Multolupa*. *J. Exp. Bot.* 47: 1709-1716.
- (3) DE MARÍA, N. (2004): Efecto del glifosato sobre la simbiosis *Lupinus albus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- (4) DE MARÍA, N.; BECERRIL, J. M.; GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; HERNÁNDEZ, A.; DE FELIPE, M. R. and FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. (2006): New Insights on Glyphosate Mode of Action in Nodular Metabolism: The Role of Shikimate Accumulation. *J. Agricul. Food Chem.* 54: 2621-2628.
- (5) ZORNOZA, P.; VÁZQUEZ, S.; ESTEBAN, E.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. and CARPENA, R. (2002): Cd-stress in nodulated white lupin: Strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 1003-1009.
- (6) PASTOR, J.; HERNÁNDEZ, A. J.; PRIETO, N. and FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. (2003): Accumulating behaviour of *Lupinus albus* l. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. *J. Plant Physiol.* 160: 1457-1465.
- (7) DE LORENZO, C. (1992): Efecto de la aplicación de nitrato sobre la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno y sobre el metabolismo de especies tóxicas de oxígeno en nódulos de lupino. Tesis Doctoral.
- (8) GONZÁLEZ-SAMA, A. (2003): Procesos iniciales del establecimiento de la simbiosis *Lupinus albus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias (Sección Biológicas). Universidad Autónoma de Madrid.

- (9) GONZÁLEZ-SAMA, A.; LUCAS, M. M.; DE FELIPE, M. R. and PUEYO, J. J. (2004): An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). *New Phytol.* 163: 371-380.
- (10) FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; LUCAS, M. M.; DE FELIPE, M. R.; BOSCA, L.; HIRT, H. and GOLVANO, M. P. (2006): Involvement of Mitogen-activated Protein Kinases in the Symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *J. Exp. Bot.* 57: 2735-2742.
- (11) FEDOROVA, E.; REDONDO, F. J.; KOSHIBA, T.; DE FELIPE, M. R.; PUEYO, J. J. and LUCAS, M. M. (2005): Aldehyde oxidase (AO) in the root nodules of *Lupinus albus* *Medicago truncatula*: Identification of AO in meristematic and infection zones. *Mol. Plant. Micro. Interact.* 18: 405-413.
- (12) VIVO, A.; ANDREU, J. M.; DE LA VIÑA, S. and DE FELIPE, M. R. (1989): Leghaemoglobin in lupin plants (*Lupinus albus* L. cv. Multolupa). *Plant Physiol.* 90: 452-457.
- (13) STUDER, D.; HENNECKE, H. and MÜLLER, M. (1992): High-pressure freezing of soybean nodules leads to an improved preservation of ultrastructure. *Planta.* 188: 155-163.
- (14) DE FELIPE, M. R.; LUCAS, M. M.; LECHAIRE, J. P.; NICOLAS, G.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. and POZUELO, J. P. (1997): Comparative study of two cryotechniques to elucidate real functional aspects of legume nodules development. *J. Plant. Physiol.* 150: 428-436.
- (15) KATINAKIS, P.; KLEIN LAKHORST, R. M.; LOUWERSE, J.; VAN KAMMEN, A. and VAN DEN BOSCH, R. C. (1988): Bacteroid-encoded proteins are secreted into the peribacteroid space by *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Mol. Biol.* 11: 183-190.
- (16) VANDEN BOSCH, K. A.; BRADLEY, D. J.; KNOX, J. P.; PEROTTO, S.; BUTVHER, G. W. and BREWIN, N. J. (1989): Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identify by immunochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO J.* 8: 967-978.
- (17) POZUELO, J. M.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; DE LORENZO, C.; MOLINA, C. y DE FELIPE, M. R. (1993): Estudios comparativos de fijación Biológica de nitrógeno en tres leguminosas de zonas áridas o semiáridas. X Reunión Nacional de la SEFV. *III Congreso Hispano-Portugués de Fisiología Vegetal*. Pamplona.
- (18) IANNETTA, P. P. M.; DE LORENZO, C.; JAMES, E. K.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; SPRENT, J. I.; LUCAS, M. M.; WITTY, J. F.; DE FELIPE, M. R. and MINCHIN, F. R. (1993): Oxygen diffusion in lupin nodules. I. Visualization of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.* 44: 1461-1467.
- (19) DE LORENZO, C.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. and DE FELIPE, M. R. (1998): Subcellular localization of glycoprotein epitopes during the development of lupin root nodules. *Protoplasma.* 201: 71-84.
- (20) GUASCH, L. M. (1998): Factores estructurales fisiológicos y genéticos en la regulación de la difusión de oxígeno en nódulos de *Lupinus albus* L, cv. Multolupa, Tesis Doctoral ETSIA. Madrid.
- (21) GUASCH, L. M.; DE FELIPE, M. R. and FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. (2001): Effects of different concentrations on nitrogenase activity, respiration and O₂ diffusion resistance in *Lupinus albus* L. cv. Multolupa nodules. *J. Plant Physiol.* 158: 1395-1402.

Receptores de feromonas de mamíferos: supervivencia y sexualidad

Recibido el 10 de julio de 2006

M.^a TERESA MIRAS PORTUGAL *

Catedrático de Bioquímica y Académica de Número de la RANF

RESUMEN

En 1995 Catherine Dulac y Richard Axel publicaron la existencia de una nueva familia de genes que codificaban los posibles receptores de feromonas, pertenecientes a la amplia familia de los de siete hélices transmembranares y acoplados a proteínas G. Desde entonces se han clonado nuevos genes que han sido agrupados en dos familias, los receptores vomeronasales tipo 1 y 2, V1R y V2R, con diferente estructura y situados con diferente distribución en el órgano vomeronasal. La naturaleza química de las feromonas y de las proteínas que las asocian y transportan conocidas como lipocalinas es otro de los aspectos de los que se dispone de abundante información. Los mecanismos de transducción de la señal mediada por feromonas sobre los receptores V1R y V2R implican la activación de la fosfolipasa C tipo β_2 , PLC β_2 , generando el fosfatidilinositol trifosfato y el diacilglicerol en la cara interna de la membrana neuronal. El diacilglicerol es un ligando endógeno, que permite la apertura del canal de la familia TRPC (Transient Receptor Potential Channel) denominado TRPC2 que se abre y deja pasar iones Ca^{2+} y Na^+ al interior de la neurona sensorial, iniciando la despolarización de la membrana y originando el potencial de acción. La señal eléctrica es conducida al bulbo olfativo auxiliar por axones que llegan de modo disperso y establecen conexión con las células mitrales, las cuales envían sus prolongaciones hasta el sistema límbico y otras estructuras cerebrales, donde influyen o provocan las respuestas de supervivencia de la especie, entre ellas las de apareamiento y agresividad. Un aspecto relevante desde el punto de vista evolutivo es que en primates el gen TRPC2 es un

* Conferencia impartida en la Real Academia Nacional de Farmacia el día 27 de octubre de 2005.

E-mail: mtmiras@vet.ucm.es

pseudogen sin funcionalidad y por lo tanto el órgano vomeronasal es un vestigio carente de función. Recientes estudios indican que la captación de feromonas en primates se realiza a través del epitelio olfativo y el bulbo olfativo principal e incluso en otros mamíferos esta estructura parece mediar en algunas respuestas especie específicas.

Palabras clave: Bulbo olfativo accesorio.—Canales TRPC2.—Diacilglicerol.—Diacilglicerol quinasa.—Feromonas.—Lipocalinas.—Órgano vomeronasal.—Receptores vomeronasales.—V1R.—V2R.

ABSTRACT

Mammalian pheromone receptors: survival and sexuality

In 1995 Catherine Dulac and Richard Axel discovered a new gene family corresponding to the pheromone receptors. They were members of the seven transmembrane helix coupled to G proteins. Since then, new genes have been cloned and grouped according their sequence homology in two main families of vomeronasal receptors the V1R and the V2R. They exhibit different distribution pattern at the vomeronasal epithelium, where they are coupled to different G proteins. The chemical nature of the mammalian pheromones is very diverse and can associate with proteins called lipocalins to reach the vomeronasal organ. The transduction mechanisms of pheromone receptors, V1R and V2R, require respectively a Gi and a Go proteins, to further activate a phospholipase C, the PLC β_2 . This enzyme hydrolyses the phosphatidyl inositol located at the plasma membrane originating phosphatidylinositol triphosphate and diacylglycerol. Diacylglycerol is an endogenous ligand that opens the TRPC2 channel (Transient Receptor Potential Channel), allowing the entrance of cations, mostly Ca²⁺ y Na⁺. The membrane depolarisation at the vomeronasal neuron originates the action potential that is sent to the accessory olfactory bulb by the axon, which in a different way as those from the main olfactory epithelia, do not organise the axonal prolongations and reach the mitral neurones in a disperse way, without forming a glomerular structure, afterwards the mitral cells send their axons to the limbic system and other cerebral structures related to aggressive behaviour and mating. It is relevant to underline that in monkeys from the old world and primates including humans, the vomeronasal organ is only a vestigial structure without function. The reason relies on the TRPC2 gene, which is a pseudo gene, without physiological function. Recent experimental approaches have demonstrated that the sensing of some pheromonal signals in these species, and also in mammals with a functional vomeronasal organ, can be carried out by the main olfactory epithelia through the main olfactory bulb. This structure being also connected to the hypothalamus, where neurones releasing LHRH can control sexual behaviour. These data confirm the broad possibilities of signalling through pheromones and that much effort is still required to fully understand their possibilities.

Key words: Accessory olfactory bulb.—Diacylglycerol.—Diacylglycerol kinase.—Lipocalines.—Pheromones.—TRPC2 channel.—Vomeronasal organ.—Vomeronasal receptors.—V1R.—V2R.

INTRODUCCIÓN

Las feromonas son mensajeros químicos especie específicos. Algunos animales liberan sustancias químicas en su entorno para influenciar el comportamiento o fisiología de los miembros de la misma especie. Las feromonas fueron descubiertas en insectos, pero en este artículo haremos especial referencia a los mamíferos. Las feromonas juegan un importante papel en el comportamiento sexual y social, así como en la fisiología reproductiva de muchas especies de mamíferos. El descubrir la naturaleza de estas sustancias, así como la estructura de sus receptores y sus mecanismos de señalización ha supuesto un reto científico, algunos de cuyos aspectos están todavía pendientes de ser resueltos. Una gran aportación fue la de Catherine Dulac y Richard Axel, quienes publicaron en 1995 la existencia de una nueva familia de genes que codificaban los posibles receptores de feromonas, pertenecientes a los siete hélices transmembranares y acoplados a proteínas G (1).

La naturaleza química de las feromonas es muy diversa y se conoce una mínima parte, algunas son volátiles, pero todas se suelen liberar asociadas a proteínas denominadas lipocalinas, que son abundantes en la orina de mamíferos, o en otras secreciones, como el sudor y la saliva. Uno de los aspectos en pleno desarrollo es determinar qué receptor está implicado en el reconocimiento de cada una de las feromonas y las técnicas para el análisis de respuesta de las neuronas sensitivas. En muchos casos el reconocimiento de las feromonas por los receptores necesita la presencia de las lipocalinas, con lo cual la definición de feromona es más ambigua y el mecanismo de reconocimiento más complejo.

Las neuronas sensibles a feromonas están localizadas en el órgano vomeronasal con una distribución en la zona apical o basal que depende de la familia de receptor, V1R o V2R, que exprese la neurona sensitiva. El recorrido de los axones de las neuronas que contienen receptores de feromonas es diferente de las que contienen los receptores olfativos que están localizadas en el epitelio olfativo principal.

La zona de proyección de los axones vomeronasales es al bulbo olfativo auxiliar. La transducción de la señal de feromonas ha puesto de manifiesto la riqueza y complejidad de los receptores de siete hélices transmembranares para enviar información al interior de la célula, permitiendo analizar acciones mediadas fundamentalmente por las subunidades $\beta\gamma$ como activadoras de una fosfolipasa $C\beta_2$ y no por la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas. Otro hito importante es que de los segundos mensajeros formados, es el diacilglicerol, que permanece asociado a la membrana, el que media la apertura de los canales conocidos como TRPC2 (Transient Receptor Potential Channel), que son específicos del epitelio vomeronasal. La filogenia de estos canales y su funcionalidad han aportado claves esenciales para comprender las respuestas de especie, pero han generado nuevas incógnitas sobre la respuesta a feromonas en los primates.

En esta revisión trataremos de dar una panorámica de la situación actual del tema, fundamentalmente en mamíferos, y abordaremos los siguientes aspectos:

1. Naturaleza química de las feromonas y proteínas de asociación y transporte.
2. Receptores de feromonas, estructura y localización en el órgano vomeronasal. Proyección al bulbo olfativo.
3. Mecanismos de transducción de la señal de feromonas.
4. Los canales TRPC, filogenia, diferencias entre mamíferos, el caso particular de los primates.
5. Feromonas captadas por el bulbo olfativo, importancia en el comportamiento sexual, nuevos datos.

1. NATURALEZA QUÍMICA DE LAS FEROMONAS Y PROTEÍNAS DE ASOCIACIÓN Y TRANSPORTE, LIPOCALINAS

1A. Naturaleza de las feromonas

La primera feromona descubierta fue aislada del órgano sexual localizado en el extremo del abdomen de la hembra de la mariposa

de la seda, *Bombyx mori*. El descubridor fue Adolf Butenandt en el año 1956. Este científico alemán había sido galardonado con el Premio Nobel de química en 1939 por su contribución al conocimiento de la estructura de las hormonas esteroídicas. La primera feromona se denominó Bombykol, es un alcohol alifático de 16 átomos de carbono e insaturado (E,Z)-10,12-hexadecadien-1-ol (Figura 1) (2). Curiosamente el receptor de esta feromona, que está presente solamente en el macho, expresándose en las antenas, ha tardado más de diez años en ser identificado con respecto a los receptores de mamíferos (3). Este receptor es absolutamente específico de la forma alcohol, pues una modificación tan ligera como la oxidación a aldehído, el bombycal, produce una ausencia total de estimulación del receptor. Otras isomerías, como el cambio cis -trans de los dobles enlaces (10Z, 12E), produce un compuesto diez millones de veces menos activo. Otras mariposas nocturnas utilizan isómeros diversos o compuestos muy similares al bombykol.

Estructura, procedencia y función de algunas feromonas



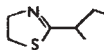
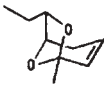
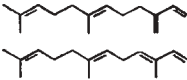
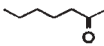
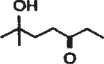
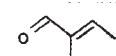
Bombykol		Mariposa de la seda- Atracción del macho
2,5-dimetilpiracina		Orina de ratón hembra- Retraso de la pubertad
2-sec-butil-4,5-dihidrotiazol		Orina y vejiga de ratón macho- sincronización del estro y aceleración de la pubertad.
2,3-dehidro-exo-brevicomín		Orina y vejiga de ratón macho- sincronización del estro y aceleración de la pubertad
α - y β -farnesenos		Glándula prepucial del ratón- Aceleración de la pubertad.
2-heptanona		Orina de ratón macho y hembra- ampliación del estro.
6-hidroxi-6-metil-3-heptanona		Orina y vejiga de ratón macho-aceleración de la pubertad
2-metilbut-2-enal		Leche de coneja- Localización del pezón materno

FIGURA 1. Estructura de algunas feromonas con función y procedencia conocida.

En general el descubrimiento y estudio de las estructuras de feromonas de mamíferos resulta mucho más complejo que en insectos, ya que estos los tienen acumulados en glándulas secretoras fácilmente identificables, mientras que en los mamíferos se encuentran en secreciones mucho más complejas, como la orina, la saliva u otras secreciones de los órganos sexuales y reproductivos. Un aspecto complejo es el modelo de análisis de la actividad feromona, una vez que se aíslan los diferentes candidatos de la secreción correspondiente, algunas veces con estructuras similares. Existen modelos diseñados para estudiar el comportamiento agresivo o dominante entre machos, o la inducción del celo o la aceleración de la pubertad en las hembras, que se encuentran entre los más empleados y todavía se depende de ellos para la caracterización de sustancias potencialmente activas. Estos modelos requieren la experimentación animal y muchas veces los resultados son de difícil interpretación. Recientemente las técnicas de electrofisiología, midiendo las respuestas generadas, o las de inducción de la señalización mediante activación de factores nucleares, entre otros el fos, que incrementan la síntesis de ARNm específicos, están resultando de gran utilidad.

Las feromonas de mamífero caracterizadas hasta el momento son de naturaleza, función y procedencia muy variada, algunas son volátiles, pero no es esencial esta cualidad. En la Figura 1 están recogidos algunos ejemplos que dejan constancia de la diversidad de las estructuras y funciones supuestas para las feromonas. Existen amplias diferencias entre las feromonas de diferentes especies de roedores, pero algunas feromonas de mamífero pueden ser muy similares a algunas de insectos, como es el caso de los farnesenos y la heptanona. Como anécdota la feromona de elefante (Z)-7-dodecen-1-il acetato es también una feromona de insectos.

1B. Proteínas de transporte de feromonas, lipocalinas

Las feromonas, sean volátiles o no, tienen que alcanzar el epitelio olfativo del órgano vomeronasal, e interactuar con los receptores específicos que se encuentran acoplados a proteínas G. Un aspecto curioso es que normalmente las feromonas se liberan asociadas con proteínas que las protegen de una rápida volatilización y que además

podrían servir para anclar la feromona de modo adecuado en el receptor. Estas proteínas se denominan lipocalinas y constituyen una amplia y extensa familia de proteínas presentes en todos los mamíferos. Son proteínas extracelulares y forman parte de una superfamilia conocida como calicinas, entre cuyos miembros se encuentran las proteínas que unen el retinol y lo transportan en el plasma sanguíneo, las que unen ácidos grasos y las avidinas que unen la biotina (4).

Las lipocalinas son proteínas de transporte que se expresan en muchas secreciones, como el mucus nasal, orina, secreciones vaginales, saliva, etc. El nombre de cada una de ellas depende del lugar y la función que se le asignó al ser descubierta, pero todas ellas tienen una estructura similar conocida como barril- β , con un bolsillo hidrofóbico en el interior (5, 6). En la Figura 2 puede observarse la estructura general de las lipocalinas. Existe una gran homología de secuencia entre las lipocalinas, aunque cada una de ellas puede presentar múltiples polimorfismos, este es el caso de la lipocalina denominada afrodisina, procedente de las secreciones vaginales de hámster, del alérgeno del caballo, de las proteínas de orina de ratón, conocidas como MUPS (Major Urinary Proteins), o las de la saliva de verraco, denominadas también SAL, que unen las hormonas sexuales androstenol y androstenona.

La estructura terciaria de las lipocalinas es muy similar, todas ellas tienen una amplia cavidad donde pueden alojar la sustancia de naturaleza hidrofóbica, generalmente lipídica. La cavidad está tapizada por los residuos de aminoácidos hidrofóbicos de las estructuras en hoja plegada- β antiparalela. Los nueve segmentos de hoja plegada están unidos por cortas secuencias en estructura al azar y un pequeño segmento en α -hélice. La cavidad interna puede variar en volumen desde unos 270 Å³ hasta 500 Å³, según el tamaño de los residuos hidrofóbicos tapizantes, lo que permite alojar estructuras de gran tamaño, como es el caso de las hormonas esteroídicas (5, 6). En la Figura 2 están representadas las cavidades de las lipocalinas de saliva de verraco, alérgeno de caballo y urinarias de ratón.

Una cuestión importante es si de algún modo las lipocalinas son necesarias para que las feromonas interactúen con los receptores del órgano vomeronasal y se desencadene la respuesta fisiológica. Las evidencias a favor o en contra existen y es posible que en algu-

nos casos la feromona sea reconocida con su proteína transportadora asociada.

Proteínas de transporte de feromonas. Estructura de las lipocalinas

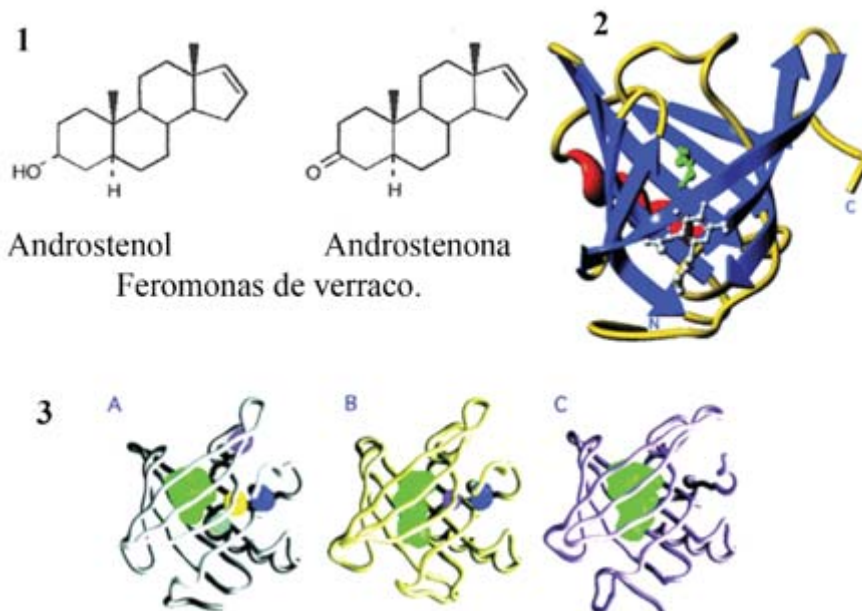


FIGURA 2. **Estructura de las lipocalinas.** La lipocalina, presente en la saliva de verraco, también denominada SAL, es una proteína que se expresa específicamente en la glándula submaxilar y une con gran afinidad las feromonas de naturaleza esteroídica androstenol y androstenona.

1. Estructura del androstenol y de la androstenona, feromonas de la saliva de verraco que inducen el celo y el apareamiento en la cerda, se liberan asociadas a la lipocalina denominada SAL.
2. Estructura de la SAL mostrando la forma en barril- β , con nueve segmentos antiparalelos en hoja plegada- β , dejando una amplia cavidad hidrofóbica.
3. Estructura comparativa de tres lipocalinas diferentes, A-SAL, B-Alergeno de caballo y C-Proteína mayoritaria de orina de ratón, conocida como MUP.

2. RECEPTORES DE FEROMONAS, ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN EN EL ÓRGANO VOMERONASAL. PROYECCIÓN AL BULBO OLFATIVO

El trabajo pionero de Catherine Dulac y Richard Axel permitió la caracterización de una nueva familia de receptores sensoriales que

podían reconocer las feromonas (1). Estos receptores fueron caracterizados mediante rastreo diferencial de librerías de cDNA construidas a partir de neuronas sensoriales individuales del órgano vomeronasal.

Desde un punto de vista comparativo, el ratón tiene unos 1.000 genes diferentes de receptores olfativos, OR, cada uno de estos genes se expresan de modo excluyente en cada una de las neuronas del epitelio olfativo principal. En el caso del epitelio sensorial del órgano vomeronasal, el número de genes que se expresan es menor y aunque todos ellos pertenecen a los receptores de siete hélices transmembranares, se pueden agrupar en dos familias muy alejadas entre sí, la familia V1R y la familia V2R, las cuales también se distribuyen de modo segregado en el epitelio vomeronasal (1, 7, 8).

2A. Familia de receptores de feromonas V1R

Los receptores de feromonas de la familia V1R, que se localizan en la zona apical del órgano vomeronasal, pueden dividirse en al menos doce subfamilias, lo que se indica con una letra, V1Ra hasta el V1Rl, el número de genes contenido en cada subfamilia varía ampliamente y depende de la especie analizada, como puede verse en la Figura 3. Estos genes carecen de intrones y presentan una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos, lo que permite el reconocimiento de sustancias muy diversas. Los ligandos de naturaleza feromona, que se asocian a cada uno de ellos, es todavía un tema pendiente, y solamente se conocen algunos, por ejemplo, la feromona que induce el celo en el ratón, la 2-heptanona, es detectada por el receptor V1Rb2 en el rango picoMolar (7). Las feromonas con estructura de farnesenos pueden ser detectadas a concentraciones entre 10^{-10} y 10^{-11} M, lo que convierte a estos receptores entre los más sensibles de todos los conocidos entre los mamíferos. Todos los genes de la familia V1R están acoplados a proteínas G del tipo $G\alpha_i$.

El ratón es el que más genes del tipo V1R tiene, e incluso el 50% de ellos podrían ser funcionales (9). Curiosamente el perro está pobremente dotado, pues tiene pocos genes y además pocos son funcionales. Lo más llamativo ocurre en los primates, en el chimpancé de los 116 genes encontrados analizando el genoma, ni siquiera uno

sería funcional, ya que todos contienen secuencias truncadas, y lo mismo en humanos, donde solamente aparecen dos genes que podrían ser funcionales (9, 10). Aunque el estudio no ha sido completo, existen evidencias de que también el cerdo, el hurón y la oveja tienen una escasa dotación de genes V1R funcionales comparados con los roedores.

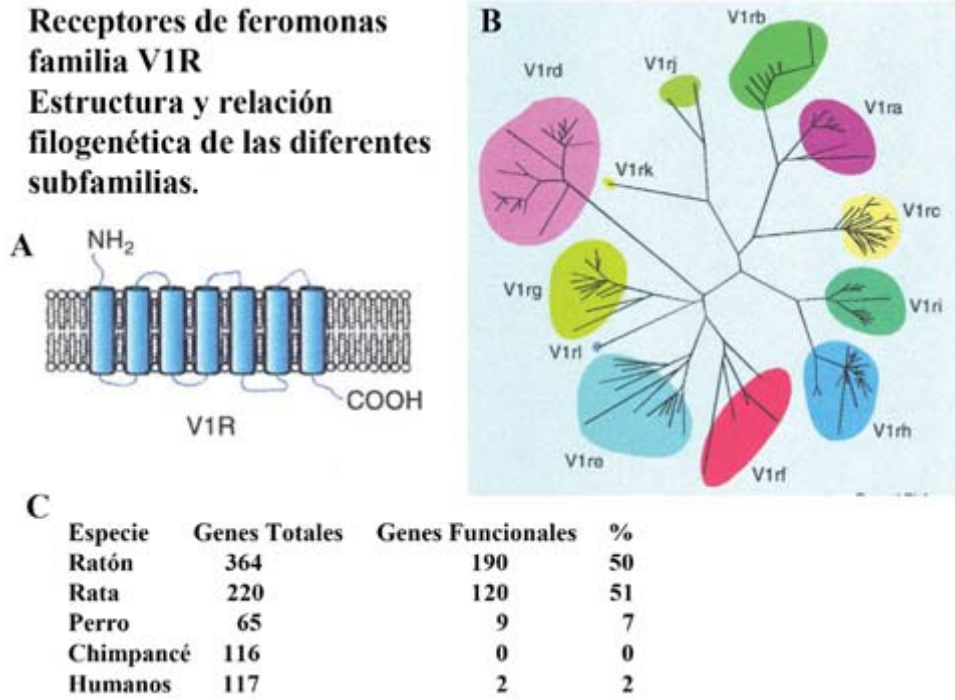


FIGURA 3. *Receptores de feromonas de la familia V1R.* Los genes se expresan en la zona apical del órgano vomeronasal.

- A. Estructura de siete hélices transmembranares de los receptores V1R.
- B. A partir del genoma de ratón se han caracterizado los genes funcionales y agrupados en doce subfamilias, según su homología (modificado de Rodríguez y col., ref. 9).
- C. Diferencias entre especies en número de genes totales y funcionales de los receptores V1R.

Los genes V1R están físicamente agrupados en nueve localizaciones genómicas tanto en rata como en ratón, cada uno de estos grupos contiene los miembros de una familia. Es probable que su nú-

mero se incrementara durante la evolución mediante duplicación génica. Los más antiguos parecen ser los genes V1R de la subfamilia L, que existían antes de la separación de los roedores de otras especies de mamíferos.

Un descubrimiento inesperado, pero con cierta lógica, es la presencia y función de receptores V1R en los espermatozoides de mamíferos (11).

La migración de los espermatozoides hasta alcanzar el óvulo es una etapa crítica para asegurar la fertilización. Mientras que los mecanismos moleculares y celulares de la fertilización han sido relativamente bien caracterizados, no ocurre lo mismo con los mecanismos de migración del espermatozoide. En el modelo del erizo de mar los espermatozoides responden a péptidos quimiotácticos que se liberan del óvulo e inducen el incremento de segundos mensajeros, como el AMP cíclico y el GMP cíclico. La pregunta es si en los mamíferos existe este par señal/receptor que guíe los espermatozoides y, en caso afirmativo, cuál es su naturaleza. Existen evidencias *in vitro* de que los espermatozoides humanos migran y se acumulan en el fluido folicular, la cuestión es cómo llegan hasta allí.

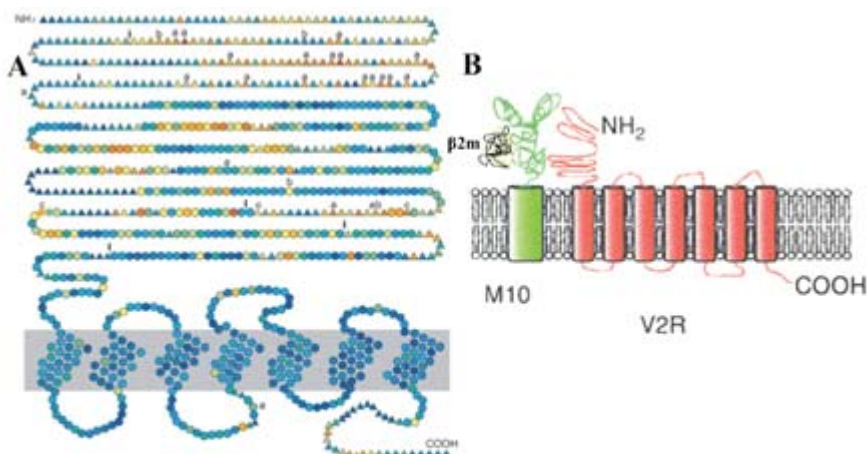
La abundancia de secreciones de naturaleza feromona en las secreciones vaginales de mamíferos y en el propio epitelio vaginal sugiere que estos compuestos puedan tener una función adicional, la de función guía para los espermatozoides. Un estudio mediante PCR de los mensajeros presentes en las células germinales en desarrollo del testículo de ratón, y la hibridación *in situ* posterior, demostró la presencia de RNA mensajeros que codifican para receptores V1R, cada subtipo en un grupo específico de espermátidas (11).

2B. Familia de receptores de feromonas V2R

Los receptores de feromonas de tipo V2R pertenecen también a los de siete hélices transmembranarias, sus genes contienen múltiples exones y se pueden agrupar en tres grandes familias, las A, B, C, según analogía de secuencia. La búsqueda de estos receptores en el genoma de roedores permitió descubrir un total de 209 y 168 secuencias completas, respectivamente, para el ratón y la rata. Como

el genoma de ratón era completo y el de la rata solamente en un 90%, es probable que existan algunos genes más en la rata. El número de genes plenamente funcionales es probable que sea más reducido. Las secuencias proteicas son muy variables y en la Figura 4 se puede ver en una escala de color las posiciones más conservadas en esta familia de receptores. Presentan una secuencia amino-terminal muy amplia, y es donde se localiza la zona de reconocimiento de la feromona, por esta razón es la más variable entre los diferentes receptores (Figura 4). La presencia de este largo dominio extracelular, localizado en el amino terminal, hace emparentar a estos receptores con los gustativos de tipo T1R y los metabotrópicos de glutamato y GABA_B. Todos estos receptores tienen el lugar de unión del ligando efector en esta zona amino-terminal, que es la más variable en la secuencia.

Receptores de feromonas de la familia V2R y proteínas asociadas



Los receptores de feromonas V2R tienen un extenso dominio amino terminal y se asocian con proteínas de la familia de los antígenos de histocompatibilidad y microglobulinas para ser funcionales.

FIGURA 4. **Receptores de feromonas de la familia V2R.**

A. Estructura de siete hélices transmembranares de los receptores V2R. Está reflejada la larga secuencia amino-terminal, donde se une la feromona, el color azul indica los residuos más conservados y hacia el rojo los más variables.

B. Interacción de los receptores V2R con otras proteínas en la membrana de la neurona sensorial. La proteína M10 pertenece a los complejos de histocompatibilidad, la $\beta 2m$ es una microglobulina.

De los receptores funcionales, aproximadamente el 84% de los receptores V2R pertenecen a la familia A, con 52 genes intactos en ratón y 48 en la rata. La familia B contiene solamente seis genes en ratón y cinco en la rata, y la familia C, que es la menos numerosa, contiene tres genes en ratón y cuatro en la rata. La homología de secuencia entre los genes de las familias A y B es un 38% de término medio, mientras que éstas con la familia C tienen solamente un 27% de homología (7, 12).

Los receptores de feromonas de tipo V2R se encuentran localizados en la zona basal del epitelio del órgano vomeronasal y están acoplados a la proteína G del tipo $G\alpha_o$. La formación de dímeros es probable en esta familia de receptores. Además, un aspecto relevante es que los V2R se coexpresan con proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), justamente con las H2-Mv. Se han identificado nueve miembros de esta familia, M1, M9, M10.1 hasta M10.6 y la M11, las cuales se expresan solamente en la zona basal del órgano vomeronasal donde se encuentran los receptores V2R. La familia M10 forma complejos multimoleculares con los receptores V2R y la β 2-microglobulina, la formación del complejo es esencial para la estabilización del receptor y su localización en la superficie celular (Figura 4).

Un aspecto a destacar es que la expresión de los genes de receptores V2R no se efectúa de modo independiente a los de las proteínas H2-Mv, existiendo una combinación preferente entre los diferentes subtipos. Una hipótesis plausible es que esta asociación preferente posibilita el reconocimiento no sólo de sus propios componentes, sino también de congéneres estrechamente relacionados que liberen señales asociadas a MHC, mediando aspectos importantes del comportamiento social de los roedores, entre ellos el reconocimiento de mayor o menor proximidad parental y posiblemente el apareamiento (13). Esta hipótesis ha sido recientemente confirmada por el grupo de K. Touhara en Japón (14), el cual consiguió aislar la señal química que induce el apareamiento en ratones. La historia del descubrimiento merece la pena ser contada, lo que se hace en el próximo epígrafe.

2C. Péptidos sexo específicos

El grupo de Touhara en la Universidad de Tokio estaba investigando las señales químicas que inducían el apareamiento en ratones. Comenzó ensayando los compuestos ya descritos, como feromonas, algunos de los cuales se encuentran en la Figura 1. Comenzado el estudio descubrió que realmente no parecían ser detectados por el órgano vomeronasal con una función definida en el apareamiento. Pensó entonces que deberían de existir otros compuestos con actividad feromona de naturaleza diferente. Analizó de nuevo la orina en búsqueda de nuevos compuestos, pero no obtuvo resultados positivos. Una joven estudiante de doctorado de su grupo, H. Kimoto, comenzó a estudiar una pequeña glándula presente debajo de la oreja y obtuvo respuestas prometedoras. Esta glándula, que se encuentra específicamente en el ratón macho, es análoga a las glándulas lacrimales, a pesar de su localización. Que una feromona pudiera liberarse en las lágrimas era difícil de creer, pero a nadie se le había ocurrido antes (14).

Otra enorme sorpresa la deparó el hecho de que la sustancia secretada no era volátil, lo cual es poco frecuente en las feromonas. Esta característica hacía necesario el contacto físico previo a la detección mediante frotamientos de la zona facial. La purificación del compuesto a partir de la glándula lacrimal extraorbital demostró que tenía naturaleza peptídica, de 7-kDa de peso molecular y se le conoce como ESP1 (Exocrine Gland-Secreting Peptide 1), el 1 por ser el primero descubierto. El gen que lo codifica procede de una amplia familia, de función desconocida, agrupada en la proximidad de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC). El ESP1 es secretado en la lágrima de los ojos del macho y transferido al órgano vomeronasal de la hembra donde estimula neuronas sensoriales que expresan un subtipo específico de receptores V2R y origina una respuesta eléctrica. Estos resultados sugieren que el ratón puede responder a péptidos sexo-específicos liberados de glándulas exocrinas y transferidas al órgano vomeronasal mediante contacto directo.

Como curiosidad señalar que en medios acuáticos las ranas emplean péptidos sexo-específicos de 10-25 aminoácidos de tamaño y en las salamandras los machos envían péptidos de 10 a 22 kDa a

las narices de las hembras durante el cortejo. Cada animal parece haber desarrollado una estrategia evolutiva única para transmitir las feromonas sexo-específicas no volátiles.

2D. Localización de receptores en el órgano vomeronasal y proyecciones axónicas al bulbo olfativo

El órgano vomeronasal tiene una estructura tubular alargada, con un lumen interno estrecho y se encuentra en el septum nasal, estando conectado con la cavidad nasal por un conducto estrecho. Las neuronas sensoriales del órgano vomeronasal están situadas en forma de media luna, rodeando el lumen. Cerrando la estructura de modo longitudinal se encuentra una amplia vascularización sanguínea (Figura 5). El órgano sensorial está protegido por una cápsula ósea y cartilaginosa. Esta estructura impide la llegada directa del aire con los diferentes estímulos a las neuronas vomeronasales, al contrario de lo que ocurre con el epitelio olfativo principal. Por lo tanto, la llegada de los estímulos mediados por sustancias no volátiles a las neuronas vomeronasales requiere de un contacto directo y un mayor aporte sanguíneo, lo que no es necesario cuando se trata de sustancias volátiles.

Las dos familias de receptores de feromonas, V1R y V2R tienen diferente localización en el epitelio sensorial. Las neuronas que contienen los receptores V1R se localizan en la zona apical y las que contienen los V2R en la zona basal, ambas neuronas son bipolares (Figura 5). Mediante técnicas de hibridación *in situ* y construcciones de diversos genes aislados, los grupos de Linda Buck y Catherine Dulac demostraron que cada neurona expresa un mensajero diferente (8, 15). La prolongación sensorial que da al lumen tiene forma de borla con cilios, que es donde se encuentran los receptores específicos y la maquinaria necesaria para la transducción primaria de la señal, que de hecho pueden emplearse como marcadores celulares. La prolongación axónica transmite la señal hasta una zona específica del bulbo olfativo denominada bulbo olfativo auxiliar. Para estudiar el camino seguido por los axones fueron necesarias construcciones que permitieran visualizar el recorrido axonal y los resultados fueron diferentes a los obtenidos con las neuronas del epitelio olfativo principal, en el cual las neuronas, expresando el mismo recep-

tor, agrupan sus axones en haces hasta alcanzar un glomérulo específico donde conectan con una célula mitral que hace de colectora de múltiples neuronas sensoriales (16, 17).

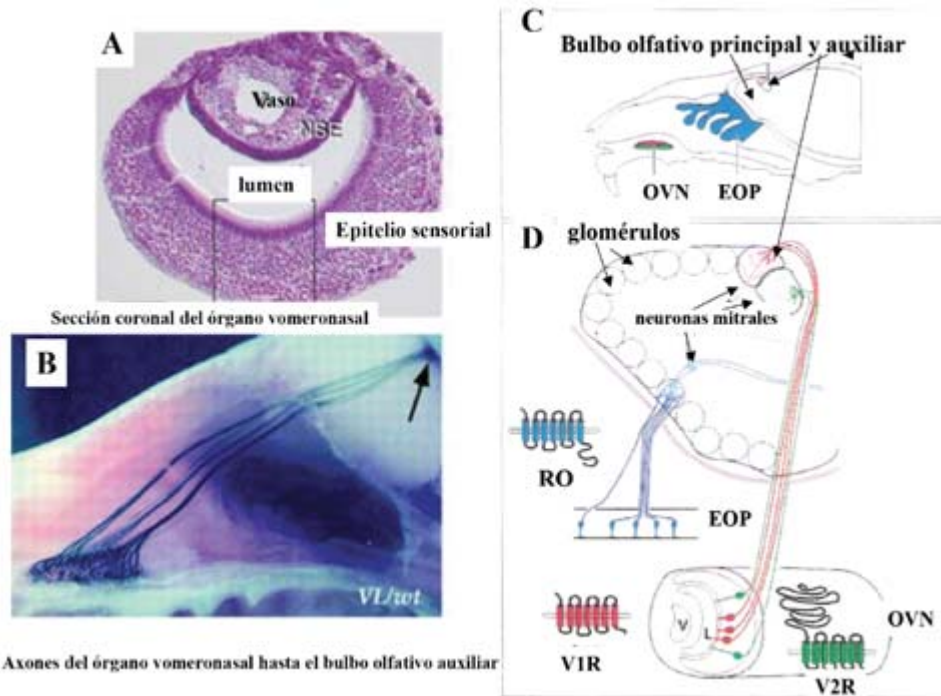


FIGURA 5. *Localización del órgano vomeronasal y morfología.*

Por el contrario, los axones procedentes del órgano vomeronasal son más largos y no se agrupan en función de la especificidad del receptor que expresan, viajando solitarios hasta alcanzar la zona específica del bulbo olfativo auxiliar. Es de destacar que al establecer las sinapsis con las células mitrales no forman glomérulos, aunque las terminales procedentes de neuronas sensoriales idénticas suelen formar sinapsis con dendritas de la misma célula mitral. Desde el bulbo olfativo auxiliar, las células mitrales envían los axones hacia el núcleo basal de la *estría terminalis* y posteriormente al núcleo basal del tracto olfativo accesorio, la amígdala medial y el núcleo posteromedial de la amígdala, que pertenecen al sistema de recompensa del cerebro, el sistema límbico (Figura 6) (18).

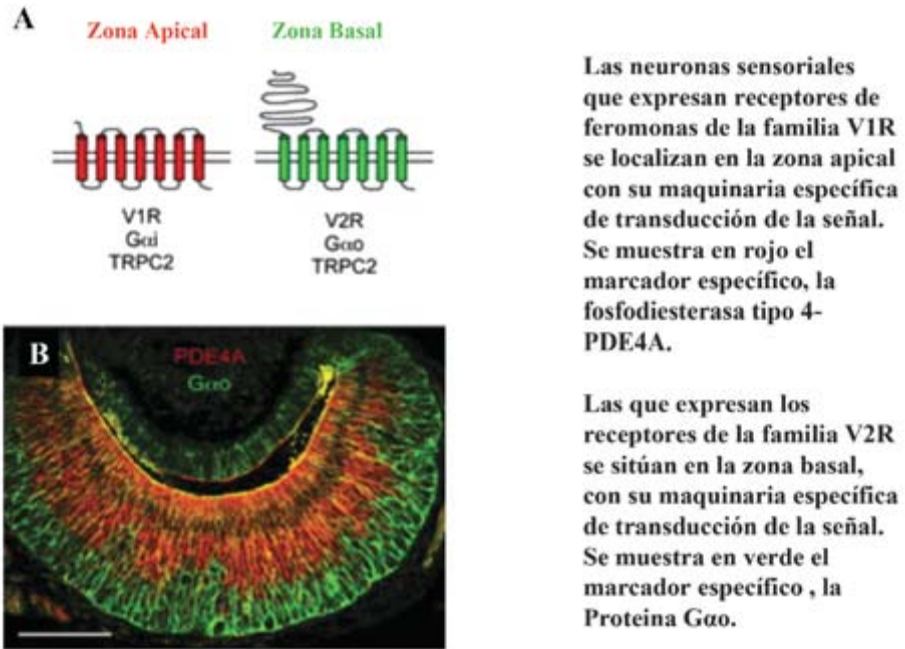


FIGURA 6. *Distribución de los dos tipos de receptores de feromonas en el órgano vomeronasal. A. Tipos de receptores y proteínas G acopladas específicamente. B. Localización de las dos familias de receptores V1R y V2R en una sección del órgano vomeronasal.*

3. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE FEROMONAS. ¿CÓMO SE GENERA EL POTENCIAL DE ACCIÓN EN LAS NEURONAS SENSORIALES?

La transducción de la señal generada por activación de los receptores de feromonas resultó ser muy diferente de la de los receptores olfativos presentes en el epitelio olfativo principal. Los receptores olfativos están acoplados a proteínas G olfativas, $G\alpha_{olf}$, que activan el enzima adenilato ciclasa, específica de este tejido, y formación de AMPc, lo que produce la apertura posterior de canales sensibles a este nucleótido, siendo este mecanismo común para todos los receptores olfativos.

En el órgano vomeronasal los diferentes receptores V1R y V2R están acoplados a diferentes proteínas G, aunque al final son coincidentes en la apertura de un canal, el TRPC2, que permite la entrada de cationes ocasionando la despolarización de la membrana y el inicio del potencial de acción (Figura 7) (19).

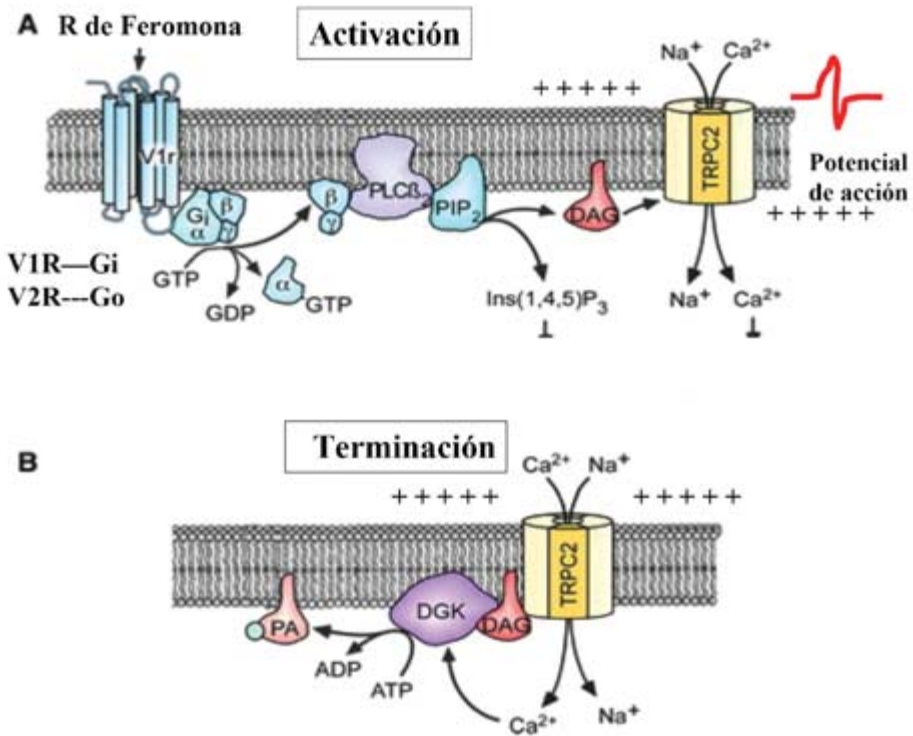


FIGURA 7. **Mecanismos de transducción de los receptores de feromonas.** **A.** Los receptores V1R y acoplados a Gi, y los V2R acoplados a Go, inducen el intercambio de nucleótidos en sus respectivas proteínas G acopladas. Se intercambia entonces el nucleótido GDP por el GTP en las subunidades α_i o α_o, respectivamente, y liberando las subunidades βγ que se mueven en el plano de la membrana plasmática y activan alostéricamente la fosfolipasa Cβ, PLC β, el diacilglicerol (DAG), producto de este enzima es el activador alostérico del canal TRPC2, que permite el paso de cationes Ca²⁺ y Na⁺, iniciando la despolarización de la membrana y el potencial de acción. **B.** La estimulación finaliza por separación de la feromona del receptor específico y eliminación del diacilglicerol mediante un enzima, la diacilglicerol quinasa (DGK), que forma ácido fosfatídico (PA), reciclando así todos los elementos implicados en la respuesta y produciéndose el cierre del canal, el TRPC2.

Los receptores V1R, al ser activados por la unión de una feromona específica interaccionan con una proteína G_i heterotrimérica, permitiendo la interacción de ésta con GTP y la separación de las subunidades α_i de las $\beta\gamma$.

Los receptores V2R, al ser activados interaccionan con una proteína G_o heterotrimérica, permitiendo el intercambio del nucleótido GDP por el GTP y la separación de las subunidades α_o de las $\beta\gamma$.

Sea cual fuere el receptor activado y el subtipo de neurona del órgano vomeronasal, van a ser las subunidades $\beta\gamma$ las que van a mediar en la cascada de señalización, que es común para todas las células de este epitelio sensorial. Estas subunidades activan el enzima de la membrana plasmática denominada fosfolipasa C tipo β_2 , $PLC\beta_2$. Este enzima hidroliza el fosfatidil inositol bisfosfato, PIP_2 , sustrato localizado en la cara interna de la membrana plasmática, formándose dos productos de la hidrólisis, el diacilglicerol, DAG, y el inositol trifosfato, $Ins(1,4,5)P_3$. Estos productos son importantes segundos mensajeros en las cascadas de señalización. El inositol trifosfato induce la movilización del calcio intracelular, y salida de los reservorios del retículo endoplasmático. Por su parte, el diacilglicerol, DAG, al unirse a los canales de tipo TRPC2, localizados en la membrana plasmática de la célula sensorial, los abre facilitando el paso de los cationes Na^+ y Ca^{2+} , lo que produce la despolarización de la membrana y el inicio del potencial de acción, que se propaga por la presencia de canales de Na^+ y Ca^{2+} sensibles a voltaje.

La señalización finaliza mediante un enzima denominada diacilglicerol quinasa, DGK, que transforma el diacilglicerol en su producto fosforilado, el ácido fosfatídico, PA, con la participación del ATP (Figura 7) (20).

4. FAMILIA DE CANALES TRP. CANALES TRPC2, SU IMPORTANCIA EN EL ÓRGANO VOMERONASAL. ASPECTOS EVOLUTIVOS

Los canales TRP, se denominan así por las siglas inglesas que definen sus propiedades (Transient Receptor Potencial). El descubrimiento de que uno de ellos, el TRPC2, estaba implicado en la trans-

ducción de la señal de feromonas en mamíferos se debe a Emily Liman, David Corey y Catherine Dulac, quienes lo postularon como candidato en una publicación de 1999 (21). Este canal pertenece a una amplia familia con múltiples funciones en el sistema nervioso y es interesante conocer algunos aspectos generales de estructura y función de esta superfamilia.

4A. Aspectos generales de los canales TRP

La captación de estímulos somatosensoriales que nos informan de situaciones peligrosas es el modo de mantener nuestra integridad física. La detección de estímulos dolorosos traumáticos, del exceso de calor, o incluso del frío, tienen en común elementos similares que son canales de la superfamilia TRP. El descubrimiento de estos canales se debe fundamentalmente al trabajo pionero del grupo de David Julius en California (22, 23). La familia de proteínas TRP fue primero descubierta en la mosca del vinagre, *Drosophila*, como tantas otras con funciones esenciales en mamíferos.

La familia de los canales TRP está formada por más de veinte productos génicos diferentes, agrupados en seis familias en base a su homología de secuencia: TRPC, TRPV, TRPP, TRPM, TRPN y mucolipinas.

El clonaje del primer receptor TRPV, conocido como TRPV1 o receptor de vanilloides, supuso un punto de inflexión en el conocimiento de los mecanismos que participan en la captación de estímulos nociceptivos, en este caso relacionados con el calor o acidificación del medio externo, y que pueden ser sensibilizados durante las situaciones inflamatorias, la existencia de estos receptores permitió explicar la sensación de calor debida al consumo de pimientos picantes, *Capsicum annuum*, ya que la capsaicina, sustancia responsable de esta sensación, se une al receptor de vanilloides en su cara interna. La familia TRPV contiene en la actualidad seis genes, todos ellos son proteínas con seis hélices transmembranares, que se asocian formando un tetrámero con un poro que permite el paso de cationes, fundamentalmente Ca^{2+} y Na^+ . Los miembros de la familia tienen umbrales de sensibilidad al calor diferentes, por ejemplo, el TRPV3 se activa con el calor nocivo, cuando se exceden los 53° C.

Por su importancia en la generación de la sensación dolorosa, los canales TRPV son una diana farmacológica importante en la actualidad (24).

Una pequeña pincelada de la familia TRPM nos permite descubrir que entre sus miembros están los canales responsables de la sensación de frío con las bajas temperaturas y también que sustancias químicas como el mentol producen sensación de frescor al actuar sobre un receptor de esta familia, el TRPM8.

La familia de canales TRPC tiene siete miembros con funciones y regulación muy diversa, actuando como canales que se abren para rellenar los reservorios de calcio intracelular, aunque otros parecen mediar respuestas como los canales operados por ligando. Tienen una amplia distribución y en muchas células están asociados a las caveolas, donde se organiza la respuesta celular a señales hormonales y locales. El canal TRPC2, por su relevancia en la transducción de la señal de feromonas, será analizado en el próximo epígrafe.

4B. Importancia del canal TRPC2 en el órgano vomeronasal de mamíferos. Aspectos evolutivos del canal TRPC2 en los primates

El TRPC2 fue clonado en primer lugar en *Drosophila* y después se clonaron los genes ortólogos de humano, ratón, rata y bovino (21, 25). Es el gen que tiene menor homología de secuencia con todos los otros TRPC. Los análisis de la secuencia indican que la proteína tiene seis hélices transmembranares y extensos dominios en el amino y carboxilo terminal de la proteína, que son zonas de regulación e interacción con el citoesqueleto. Entre las hélices 5 y 6 se encuentra la secuencia de aminoácidos que se postula como formadora del poro que permite el paso de cationes Ca^{2+} y Na^{+} . El canal funcional requiere la asociación de cuatro subunidades y la activación requiere la interacción con el diacilglicerol, que se comporta como un ligando alostérico. La entrada de los cationes Ca^{2+} y Na^{+} despolariza la membrana originando un potencial de acción que se propaga desde el extremo sensorial de la neurona, ya que estos canales están exclusivamente localizados en los cilios del extremo sensorial (Figura 8).

Para investigar el papel desempeñado por los canales TRPC2 en la señalización de feromonas, dos laboratorios de modo independiente generaron ratones knock-out TRPC2^{-/-} (26, 27). En estos animales, genéticamente modificados, se analizaron las respuestas electrofisiológicas a diferentes compuestos de naturaleza feromona presentes en la orina y se demostró que no eran capaces de generar respuesta alguna. La presencia de los canales TRPC2 en los espermatozoides planteaba la pregunta de si eran necesarios para la reacción acrosomal, pero no parece haber diferencias respecto a la fertilidad entre el ratón silvestre y el knock-out.

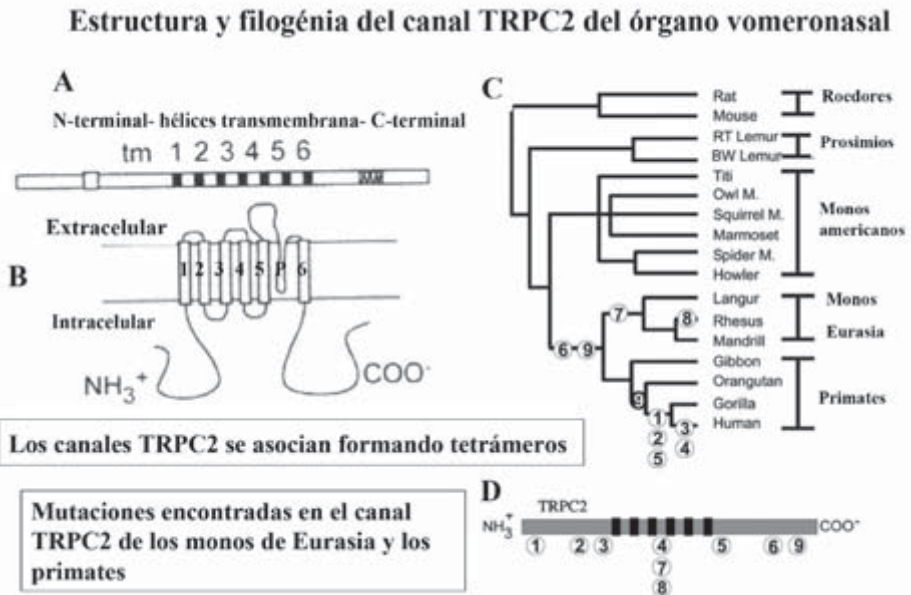


FIGURA 8. *El canal TRPC2 y proteínas análogas.* **A** y **B.** Esquema del canal TRPC2, se muestran los seis segmentos transmembranares y la porción entre las hélices 5 y 6 que forma el poro del canal. Los dominios amino y carboxi terminal de la proteína son citoplasmáticos. Se requieren cuatro subunidades para formar el canal activo. **C.** Dendrograma mostrando la filogenia del canal TRPC2 en mamíferos, según analogía de secuencia. **D.** Los números indicados en C, se corresponden con las zonas mutadas o truncadas en la secuencia proteica del canal TRPC2. Todas estas mutaciones originan proteínas carentes de función. Esta es la razón por la cual el órgano vomeronasal ha dejado de ser funcional en un antepasado común de los monos de Eurasia y los primates.

Sin embargo los ratones knock-out son un excelente modelo para comprender los efectos sociales de la captación de feromonas. Los primeros ratones TRPC2^{-/-}, mostraban una reducida respuesta electrofisiológica a la señal de feromonas. En los estudios comportamentales ligados a la supervivencia de la especie, los machos son menos vigorosos y están menos interesados en el apareamiento, son además más dóciles y no inician las peleas agresivas entre machos, que son el origen del rango dominante dentro del grupo. Las hembras TRPC2^{-/-} son menos cuidadosas de su camada, muestran menos interés maternal y menor agresividad en la defensa de su prole frente a los machos intrusos (25, 26, 27).

ASPECTOS EVOLUTIVOS DEL GEN TRPC2, EL CASO PARTICULAR DE LOS PRIMATES

El TRPC2 es el elemento esencial para la transducción de todas las señales de feromonas, pues es el elemento en donde convergen todas las señales del órgano vomeronasal y se origina el potencial eléctrico que irá al bulbo olfativo auxiliar. La pérdida de función de este canal podría servir como marcador de la pérdida de función del órgano vomeronasal. Este razonamiento sirvió de partida para un estudio sistemático de la secuencia de este gen en diferentes mamíferos y sobre todo en los primates (28, 29). Los estudios demostraron que en roedores, rata y ratón el gen TRPC2 era plenamente funcional y eran filogenéticamente próximos entre sí. En los prosimios, como los lémures de Madagascar, también existían genes plenamente funcionales, y lo mismo ocurría en los monos del nuevo mundo, titis, mono aullador, mono araña, etc. Las variaciones aparecieron en los monos del viejo mundo, África y Asia, como el mono *Rhesus*, el mandril, etc. Una situación similar ocurre en los grandes monos, el gibón, el orangután y el gorila, en los cuales tampoco existe un gen TRPC2 completo funcional.

¿Cómo se encuentra el gen TRPC2 en los humanos? Esta pregunta fue la primera y más ampliamente estudiada. El gen TRPC2 en humanos tienen una única copia, se encuentre en el cromosoma 11 (11p15.5), contiene 13 exones y muestra un 85% de homología con el de ratón. Un estudio sistemático de este gen mostró que en los

humanos este gen no es funcional y acumula un gran número de mutaciones, de las cuales seis son deletéreas, ya que dan lugar a un codón de terminación, es por lo tanto un pseudogen originando formas truncadas de la proteína. Los estudios de filogenia demostraron que la primera mutación en el antepasado común de todos los monos del viejo mundo y los grandes monos fue la mutación de parada próxima al carboxilo terminal, lo que originó una proteína más corta y carente de función (29).

El hecho de que en los monos del nuevo mundo este gen sea funcional, se relaciona con la separación de los continentes hace unos 40 millones de años. Solamente el antepasado común de monos y primates del viejo mundo sufrió las mutaciones iniciales que llevaron a una pérdida total de la función del gen. Queda por descubrir la razón evolutiva por la que esta pérdida y atrofia del órgano vomeronasal no supuso la extinción de la especie. Posibles explicaciones son, entre otras, que la aparición del tercer ftopigmento visual en los primates y monos del viejo mundo pudo compensar la pérdida en la captación de feromonas. Otra posibilidad es la que veremos en el siguiente apartado y supone que el sistema olfativo principal podría servir para captar feromonas y señales de un modo más complejo y elaborado.

5. UNA VUELTA DE TUERCA: EL BULBO OLFATIVO Y LA CAPTACIÓN DE FEROMONAS

En los epígrafes anteriores poníamos de manifiesto la relevancia del órgano vomeronasal en la detección de feromonas por parte de algunos mamíferos, pero el hecho de que en los primates no exista esta vía y que en otros mamíferos esté muy limitada, e incluso que los conejos privados del órgano vomeronasal pudieran reconocer el olor y guiarse hasta el pezón materno para su lactancia, hacía pensar a muchos investigadores que la visión del bulbo olfativo respecto a la detección de feromonas era demasiado restrictiva.

Una primera evidencia de las posibles implicaciones de la vía olfatoria principal, en respuesta a feromonas, se descubrió estudiando respuestas a componentes de la orina de ratón (a). La mayoría de los mamíferos pueden reconocer a otros a partir del olor de las se-

creciones corporales, como el sudor. Para muchos animales, la orina es una fuente de información sobre la identidad y sexo de otro individuo. La naturaleza química de estas señales, y de cómo son procesadas y representadas en el cerebro es poco conocida. Recientemente, el análisis de la actividad de células nerviosas individuales en el bulbo olfativo del cerebro de ratón ha permitido detectar una región cuyas células responden solamente a un compuesto presente en la orina del macho. Este compuesto ha sido identificado como (metiltio)metanotiol. Este compuesto, el cual a los humanos les huele a ajo, es más volátil que otras feromonas y puede indicar si la orina es fresca (30). Este descubrimiento amplió las posibilidades de señalización de las feromonas, al poder activar receptores que se encuentran en el bulbo olfativo principal y de ahí a las células mitrales, sin activar receptores del órgano vomeronasal.

Esta función del sistema olfativo principal se ha visto confirmada y ampliada recientemente para muchas otras moléculas con función feromona y permitiría explicar la captación de feromonas por los primates, incluido el hombre, cuyo órgano vomeronasal es solamente un vestigio, y carece de conexión funcional.

La confirmación fuera de toda duda de que el sistema olfativo principal está implicado en la captación de feromonas por los primates se debe a los grupos de Linda Buck y Catherine Dulac. De nuevo haciendo uso de metodología poderosa, diseñaron modelos de estudio que permitieran analizar el papel del sistema olfativo principal en la captación de feromonas (31, 32, 33).

El punto de partida fue la zona cerebral de mamíferos donde se controla el apareamiento y el comportamiento reproductivo, que son las neuronas hipotalámicas, verdadero centro endocrino cerebral. Estas neuronas secretan la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), conocida también con el nombre de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Este sistema hipotálamo hipofisario controla la función gonadal y ovárica. Ambos grupos pensaron que las conexiones aferentes a esas neuronas hipotalámicas deberían de proceder de señales relacionadas con feromonas en su etapa más inicial y por lo tanto si seguían de modo retroactivo las conexiones podrían conocer su origen primigenio sensorial. Para demostrar esta hipótesis los abordajes experimentales fueron muy elegantes.

Circuitos cerebrales de la señalización por feromonas.

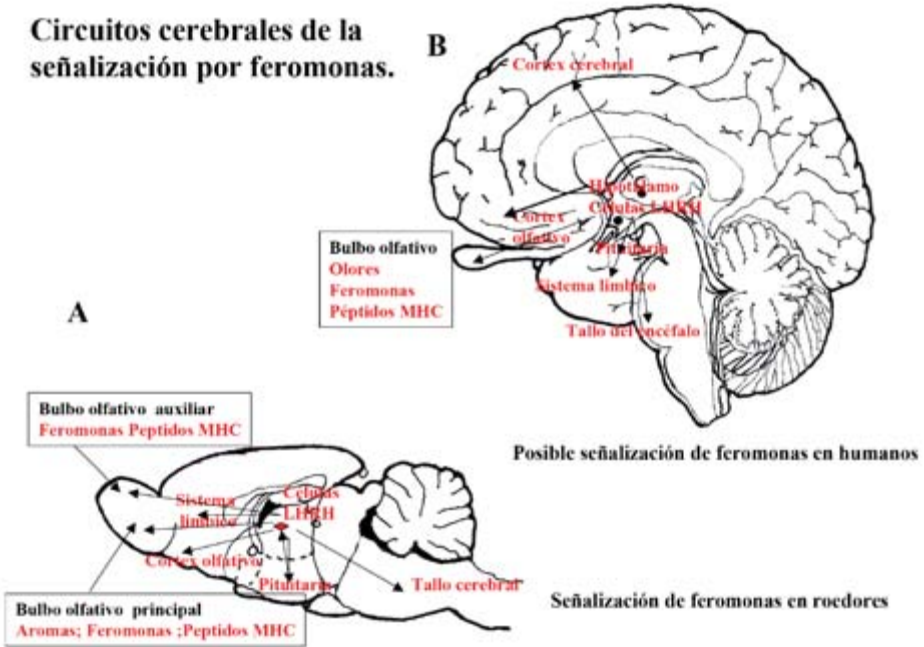


FIGURA 9. **Circuitos cerebrales para la señalización mediante feromonas.**
A. Corte sagital de cerebro de ratón mostrando las conexiones entre las neuronas hipotalámicas, que contienen LHRH y otras áreas cerebrales. **B.** Posibles conexiones del hipotálamo humano, cerebro neuroendocrino, con el córtex olfativo, bulbo olfativo y otras áreas. Recordar que en humanos y primates el órgano vomeronasal es solamente un vestigio no funcional.

El primer modelo experimental del grupo de Dulac (32) utilizó un virus fluorescente que solamente es transportado de modo retroactivo axonal en las sinapsis donde es captado y permite trazar su rastro hasta el principio de la vía sensorial si la infección viral se deja proseguir durante bastante tiempo. El virus fue inyectado en el hipotálamo de ratones, de modo que solamente fuera captado por las neuronas que contenían LH-RH. Las primeras células marcadas fueron hipotalámicas, como esperado, pero posteriormente se marcaron de modo fluorescente otras áreas cerebrales, indicando una compleja trama conteniendo las regiones olfativas principales y las somatosensoriales. En las regiones olfativas se marcaban el córtex olfativo, el bulbo olfativo principal e incluso ¡el epitelio olfativo principal!, pero no se vio ningún marcaje en el bulbo olfativo accesorio

o el órgano vomeronasal. Se demostró de este modo que es el epitelio olfativo principal el más importante en el apareamiento, mientras que el órgano vomeronasal media en comportamientos más específicos de agresividad, lucha y defensa de la prole.

El segundo modelo experimental del grupo de Buck, realizó una aproximación diferente, modificaron genéticamente un ratón para que expresara una proteína de cebada, la lectina BL (barley lectin), que puede ser captada en ambas direcciones de la hendidura sináptica. El gen se situó en la zona próxima a la región promotora de la hormona LHRH y sometido a la misma regulación. De este modo las aproximadamente 800 neuronas hipotalámicas de ratón que expresan esta hormona también expresarán la lectina de cebada, que puede ser fácilmente identificada. La distribución de esta proteína en el sistema nervioso mostró que el hipotálamo recibe conexiones, tanto del bulbo olfativo auxiliar procedente del órgano vomeronasal, como del bulbo olfativo principal procedente del epitelio olfativo principal. Las 800 neuronas hipotalámicas eran capaces de conectar con al menos 50.000 neuronas, situadas en 53 áreas cerebrales diferentes, incluyendo el córtex olfativo y mostrando en algunas áreas un acusado dimorfismo sexual (33).

Estos dos modelos ilustran claramente lo falso que resulta ajustarse a un único patrón, sin duda queda mucho por aprender sobre como las feromonas influyen la función neuroendocrina y como pueden influenciar aspectos de nuestro comportamiento, pero estos modelos sirvieron para confirmar que en los primates y humanos carentes del sistema de captación de feromonas por el órgano vomeronasal, la función podía ser realizada por el bulbo olfativo principal, existiendo amplias conexiones entre éste, el hipotálamo secretor, o cerebro endocrino, y otras áreas cognitivas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) DULAC, C. and AXEL, R. (1995): A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*. 83: 195-206.
- (2) BUTENANDT, V. A.; BECKMANN, R.; STAMM, D. and HECKER, E. (1959): *Z. Naturforsch.* 14: 283-284.
- (3) SAKURAI, T.; NAKAGAWA, T.; MITSUNO, H.; MORI, H.; ENDO, Y.; TANOUÉ, S.; YASUKOCHI, Y.; TOUHARA, K., and NISHIOKA, T. (2004): Identification and functional

- characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *PNAS*. 101: 16653-16658.
- (4) FLOWER, D. R. (1996): The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318: 1-14.
 - (5) BIANCHET, M. A.; BAINS, G.; PELOSI, P.; PEVSNER, J.; SNYDER, S. H.; MONACO, H. L. and AMZEL, L. M. (1996): The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nat. Struct. Biol.* 11: 902-906.
 - (6) SPINELLI, S.; VINCENT, F.; PELOSI, P.; TEGONI, M. and CABBILLAU, C. (2002): Boar salivary lipocalin. Three-dimensional X-ray structure and androstenol/androstenone docking simulations. *Eur. J. Biochem.* 269: 2449-2456.
 - (7) BRENNAN, P. A. and KEVERNE, E. B. (2004): Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Current Biology*. 14: R81-R89.
 - (8) HERRADA, G. and DULAC, C. (1997): A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell*. 90: 763-773.
 - (9) RODRÍGUEZ, I.; DEL PUNTA, K.; ROTHMAN, A.; ISHII, T. and MOMBAERTS, P. (2002): Multiple new and isolated families within the mouse superfamily of V1R vomeronasal receptors. *Nat. Neurosci.* 5: 134-140.
 - (10) YOUNG, J. M.; KAMBERE, M.; TRASK, B. J. and LANE, R. P. (2005): Divergent V1R repertoires in five species: Amplification in rodents, decimation in primates, and surprisingly small repertoire in dogs. *Genome Research*. 15: 231-240. (www.genome.org).
 - (11) TATSURA, H., NAGAO, H.; TAMADA, A.; SASAKI, S.; KOHRI, K. and MORI, K. (2001): Developing germ cells in Mouse testis Express pheromone receptors. *FEBS Letters*. 488: 139-144.
 - (12) YANG, H.; SHI, P.; ZHANG, Y. and ZHANG, J. (2005): Composition and evolution of the V2R vomeronasal receptor gene repertoire in mice and rats. *Genomics* 86: 306-315.
 - (13) OLSON, R.; HUEY-TUBMAN, K. E.; DULAC, C. and BJORKMAN, P. J. (2005): Structure of a pheromone receptor-associated MHC molecule with an open and empty groove. *PLoS Biol* 3: 1436-1448.
 - (14) KIMOTO, H.; HAGA, S.; SATO, K. and TOUHARA, K. (2005): Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* 437: 898-901.
 - (15) BOEHM, U.; ZOU, Z. and BUCK, L. B. (2005): Feedback loops link odor and pheromone signalling with reproduction. *Cell*. 123: 683-695.
 - (16) RODRÍGUEZ, I.; FEINSTEIN, P. and MOMBAERTS, P. (1999): Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the Mouse vomeronasal system. *Cell*. 97: 199-208.
 - (17) MIRAS, M. T. (2005): Receptores olfativos, el perfume del éxito. *Anal. Real. Acad. Nac. Farm.* 71: 439-449.
 - (18) BELLUSCIO, L.; KOENTGES, G.; AXEL, R. and DULAC, C. (1999): A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell*. 97: 209-220.
 - (19) LEINDERS-ZUFALL, T.; BRENNAN, P.; WIDMAYER, P.; CHANDRAMANI, P. S.; MAULPAVICI, A.; JÄGER, M.; LI, X.-H.; BREE, H.; ZUFALL, F. and BOEHM, T. (2004):

- MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* 306: 1033-1037.
- (20) LUO, B.; REGIER, D. S.; PRESCOTT, S. M. and TOPHAM, M. K. (2004): Diacylglycerol kinases. *Cell Signal*. 16: 983-989.
 - (21) LIMAN, E. R.; COREY, D. P. and DULAC, C. (1999): TRP2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signalling. *PNAS*. 96: 5791-5796.
 - (22) JULIUS, D. and BASBAUM, A. I. (2001): Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413: 203-210.
 - (23) CATERINA, M. J. and JULIUS, D. (2001): The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 487-517.
 - (24) FERRER-MONTIEL, A.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; MORENILLA-PALAO, C.; GARCÍA-SANZ, N.; FERNÁNDEZ-CARVAJAL, A.; FERNÁNDEZ-BALLESTER, G. and PLANELLAS-CASES, R. (2004): Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur. J. Biochem.* 271: 1820-1826.
 - (25) ZUFALL, F.; UKHANOV, K.; LUCAS, P. and LEINDERS-ZUFALL, T. (2005): Neurobiology of TRPC2: from gene to behaviour. *Eur. J. Physiol* 451: 61-71.
 - (26) LUCAS, P.; UKHANOV, K.; LEINDERS-ZUFALL, T. and ZUFALL, F. (2003): A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice. Mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40: 551-561.
 - (27) LEYPOLD, B. G.; YU, C. R.; LEINDERS-ZUFALL, T.; KIM, M. M.; ZUFALL, F. and AXEL, R. (2002): Altered sexual and social behaviours in *trp2* mutant mice. *PNAS*. 99: 6376-6381.
 - (28) FREICHEL, M.; VENNEKENS, R.; OLAUSSON, J.; STOLZ, J.; PHILIPP, S. E.; WEISSGERBER, P. and FLOCKERZI, V. (2005): Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *J. Physiol.* 567: 59-66.
 - (29) LIMAN, E. and INNAN, H. (2003): Relaxed selective pressure on an essential component of pheromone transduction in primate evolution. *PNAS*. 100: 3328-3332.
 - (30) LIN, D. Y.; ZHANG, S.-H.; BLOCK, E. and KATZ, L. (2005): Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature*. 434: 470-477.
 - (31) SHEPHERD, G. M. (2006): Smells, brains and hormones. *Nature*. 439: 149-151.
 - (32) YOON, H.; ENQUIST, L. W. and DULAC, C. (2005): Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell*. 123: 550-553.
 - (33) BOEHM, U.; ZOU, Z. and BUCK, L. B. (2005): Feedback loops link odor and pheromone signalling with reproduction. *Cell*. 123: 683-695.

New Perspectives in Ocular Pharmacology: Nucleotides as Therapeutic Agents

Recibido el 7 de octubre de 2006

JESÚS PINTOR *

*Departamento de Bioquímica, E. U. Óptica.
Universidad Complutense de Madrid*

ABSTRACT

Diadenosine polyphosphates are a group of nucleotides which modulate physiological processes in the eye such as tear secretion, corneal wound healing and intraocular pressure. This regulation is carried out by P2 purinergic receptors termed P2X and P2Y as well as dinucleotide receptors. Diadenosine polyphosphates are present in tears and when topically applied they can produce tear secretion in a process mediated by P2Y receptors. P2Y receptors are also present in corneal epithelial cells and they can accelerate the rate of re-epithelialization after superficial injuries. On the other hand, intraocular pressure is reduced by all those nucleotides activating P2X receptors. Due to the importance of the presence of these receptors in ocular structures it is possible to think in the use of dinucleotides, naturally occurring and synthetic ones, for the treatment of dry eye, corneal injuries and glaucoma.

Key words: Corneal wound healing.—Diadenosine polyphosphates.—Dry eye.—Glaucoma.—Intraocular pressure.—Nucleotide receptors.

* Discurso de ingreso como Académico Correspondiente.

Dirección de contacto: Dep. Bioquímica. E.U. Óptica. Universidad Complutense de Madrid. C/ Arcos de Jalón, s/n. 28037. Madrid. Telf.: +34-91-3946859. Fax: +34-91-3946885.

E-mail: jpintor@vet.ucm.es

Abbreviations: ABC, ATP binding cassette; ApnA, diadenosine polyphosphates; CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; HPLC, high performance liquid chromatography; IOP, intraocular pressure.

RESUMEN

**Nuevas perspectivas en farmacología ocular:
los nucleótidos como agentes terapéuticos**

Los diadenosina polifosfatos son un grupo de nucleótidos que modulan procesos relevantes de la fisiología ocular como la secreción corneal, la cicatrización corneal y la presión intraocular. Esta regulación es llevada a cabo a través de receptores purinérgicos del tipo P2 como son los P2X y P2Y, así como por el receptor de dinucleótidos. Los diadenosina polifosfatos están presentes en las lágrimas y cuando son instilados tópicamente pueden inducir la secreción lagrimal en un proceso mediado por receptores del tipo P2Y. También los receptores P2Y están presentes en las células del epitelio corneal que aceleran el proceso de cicatrización corneal tras una lesión superficial. Por otra parte, la presión intraocular se puede reducir aplicando aquellos nucleótidos que activen receptores del tipo P2X. Debido a la presencia de estos receptores en las estructuras oculares es posible pensar en el uso de los dinucleótidos, naturales o sintéticos, para el tratamiento del ojo seco, heridas corneales y el glaucoma.

Palabras clave: Cicatrización corneal.—Diadenosina polifosfato.—Ojo seco.—Glaucoma.—Presión intraocular.—Receptores de nucleótidos.

OCULAR PATHOLOGIES

In spite of the number of ocular pathologies is immense, three pathological states are now important due to their incidence in modern society: *dry eye*, *corneal wound healing* and *glaucoma*. Apart from the incidence of all of them in the world population, the two first do not have an effective treatment in most of the cases. On the other hand glaucoma has several pharmacological treatments but most of them present wide side effects. In the three cases the development of new pharmacological compounds is necessary.

The strategy of pharmaceutical companies regarding the discovery of new compounds is mainly the variation of well-established pharmaceutical species by modifying their chemical structures in order to obtain better agonists, antagonists or enzyme inhibitors. Also companies, by means of their research and development departments try to find new molecules, receptors and enzymes as pharmacological targets. Nonetheless, the discovery of new attractive compounds is mostly carried out by research centres and universities. Taking into account this point of view, we have

modestly contributed to the discovery of new biological molecules and their implications in the eye physiology and physiopathology. We have investigated the role of extracellular nucleotides and dinucleotides in the eye. Nucleotides and dinucleotides can exert extracellular actions by means of the activation of different membrane receptors termed P2 purinergic receptors, which are described in the following section.

RECEPTORS FOR EXTRACELLULAR NUCLEOTIDES

The effects of nucleotides are due to the existence of receptors in cell membranes termed P2 receptors that transmit the message into the cell producing certain changes in the cell biochemistry. In this sense, nucleotides can bind and activate to two major types of receptors, metabotropic nucleotide receptors or P2Y receptors and ionotropic P2X receptors (1, 2). P2Y receptors are seven transmembrane domain proteins coupled to phospholipase C via G proteins, although some of the newly cloned P2Y receptors can regulate adenylate cyclase and presumably can be coupled to other second messenger system (3-5). The family of P2Y receptor is formed by six cloned receptors termed as P2Y₁, P2Y₂, P2Y₃, P2Y₄, P2Y₆ and P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, and the UDP-glucose receptor (3, 6-9). P2X receptors are receptor-operated ion channels selective to small cations such as Na⁺ and Ca²⁺. These receptors are involved in fast synaptic transmission between neurones and between autonomic nerves and smooth muscle, where ATP is the main transmitter. Molecular biology has permitted the identification of up to seven P2X receptors named P2X₁- P2X₇. It is generally accepted by the scientific community that these receptors are formed by more than one subunit because each subunit contains only two transmembrane domains. The differences established between the pharmacological experiments performed in expression systems and in native tissues strongly suggests that P2X receptors are heteromeric rather than homomeric receptors (for a full review, see 10).

The eye contains P2 receptors in its structures and thus it is susceptible to be activated by the presence of nucleotides. These changes in eye physiology can include lachrymal apparatus, cornea,

ciliary body, iris, trabecular meshwork, lens, and the retina (11, 12). Not all the structures previously mentioned have been fully investigated; nevertheless it has been possible to understand the role of nucleotides and dinucleotides on corneal surface and intraocular pressure (IOP).

THE OCULAR SURFACE

There are two main pathological states regarding the ocular surface. On the one hand dry eye, and on the other hand corneal wound healing that occurs after superficial injuries. None of them have efficacious treatments and are lacking of the discovery of new substances for their care.

Dry eye and tear secretion

Tear secretion is an important physiological process because tear forms the interface between the air and the ocular tissues. Tears protect the corneal surface with antibacterial systems, such as lysozyme and lactoferrin, provide the epithelium with nutrients, and lubricate the eyelids. Also, they wash away those particles that may damage the cornea. There are situations in which some problems in the volume or in the quality of tears occur, and therefore may produce several negative effects such as corneal function failures, discomfort, and even pain (a sandy feeling that may be accompanied by irritation). If the problem is related to a reduction in the total volume, the mucin layer of the corneal epithelium will not guarantee a uniform film, thus shortening the tear break-up time. Specialists such as optometrists and ophthalmologists, by means of dyes such as fluorescein, Bengal pink, or lissamine green, can follow these changes of the normal tear film to a pathological state. Tear film stability is particularly important for contact lens wearing, because a deficient volume or a poor quality will make the adaptation of contact lenses difficult. Between 20% and 30% of contact lens wearers develop ocular dryness. Extreme conditions such as air conditioning, wind, heaters, or a prolonged read without a regular blinking frequency will facilitate an increase of tear evaporation.

Within the above percentage, between 12% and 20% reduce significantly the use of contact lenses because of the mentioned discomfort. Most of the approaches to solve this problem lie in changing the tear viscosity by the application of compounds based on preparations containing carboxymethylcellulose, hydroxypropylcellulose, or polyvinylalcohol. There are no good pharmacological solutions available to restore normal tear film properties.

Nucleotides are interesting compounds restoring the normality in those individuals presenting ocular dryness. Nucleotides and dinucleotides have been described in human and experimental animal tears. The most representative ones are the diadenosine polyphosphates, which are dinucleotides formed by two adenosines linked by a variable number of phosphates which can fluctuate between 2 and 7 (abbreviated as Ap_nA , $n = 2-7$) (13). These dinucleotides have been described by means of high performance liquid chromatography (HPLC) as presented in Figure 1A. Diadenosine triphosphate, Ap_3A , diadenosine tetraphosphate Ap_4A and diadenosine pentaphosphate Ap_5A have been described in human tears while Ap_3A was absent in rabbit tears. The concentration between human and rabbit tears were also different. While in humans the concentrations of the dinucleotides are in the nanomolar range in the animal it was in the micromolar one (14, 15).

One interesting point after demonstrating their presence in tears is to understand where these dinucleotides come from. Experiments performed in healthy human volunteers demonstrate that nucleotides and dinucleotides are released from the ocular surface, probably both cornea and conjunctiva by mechanical stress (16). It has been demonstrated that an increase in the blinking frequency produces an associated increase in the diadenosine polyphosphate tear concentration. Although the molecular mechanism has not been elucidated, it is possible, as occurs in the central nervous system, that nucleotides are liberated from nerve terminals, but there is evidence that nucleotides can be transported out of cells. Epithelial cells (17, 18), and in particular ocular epithelial cells, use different transport mechanisms as a regulated procedure for nucleotide release. The ATP binding cassette (ABC) transporter, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) or

glycoprotein P have been proposed as elements involved in the release of nucleotides (19, 20). It has been described that ATP leaves corneal endothelial cells by means of connexin hemichannels when these cells are stimulated mechanically (21). We think that the latter may be the most plausible mechanism although we cannot discard the other previously suggested.

Since diadenosine polyphosphates are present naturally in tears, experiments were performed in order to investigate whether the topical application of these substances were able to change tear production. Of all the tested dinucleotides (Ap_2A - Ap_6A , at 100 μ M), Ap_4A , Ap_5A and Ap_6A were able to increase tear secretion between 20% to 60%, the best being Ap_4A (Figure 1B). Some mononucleotides also were able to increase tear production UTP and ATP being the best ones and increasing tearing 60% and 40% respectively over the control values (14).

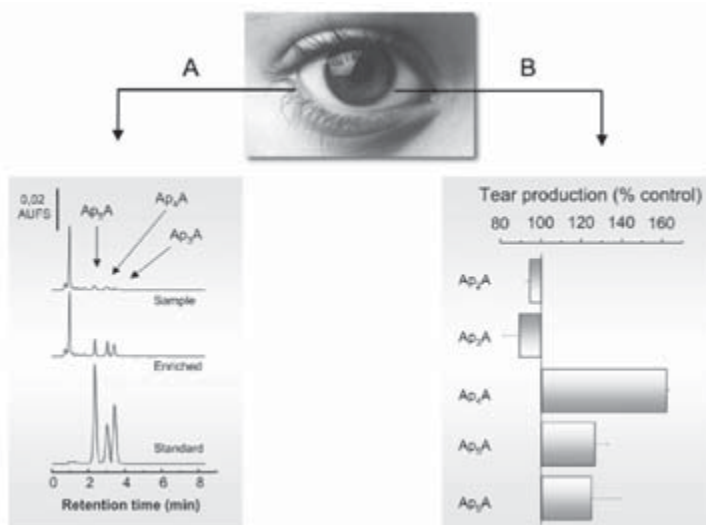


FIGURE 1. **Presence and effect of diadenosine polyphosphates on tear secretion.** **A.** The presence of diadenosine polyphosphates has been identified by high performance liquid chromatography indicating the presence of diadenosine triphosphate, Ap_3A , diadenosine tetraphosphate, Ap_4A and diadenosine pentaphosphate, Ap_5A in human tears. **B.** The topical application of 100 μ M of the dinucleotides produce a different behaviour on the rate of tear secretion depending on the phosphate chain. Among all, Ap_4A was able to increase tear secretion 60% above the normal tear production.

When a wide range of concentrations of the dinucleotides were used, it was possible to establish concentration-response curves which permitted to calculate EC_{50} values for the diadenosine polyphosphates. Ap_4A presented an EC_{50} value of 2.76 μM , Ap_5A a value of 1.77 μM and Ap_6A a value of 3.16 μM (14).

The ability of some diadenosine polyphosphates activating tear production, is indicating that they can be considered as constitutive activators of tear release being this mechanism independent from the one that naturally control the main lachrymal glands (16). Moreover, the topical application of some of these compounds such as Ap_4A , may be useful for the treatment of dry eye specially those cases in which this pathology takes place with a lack of tear volume.

The design of new pharmacological compounds with nucleotidic structure such as diquafosol aka INS365, brings interesting expectations for dry eye treatment. This compound is a congener of Ap_4A (diuridine tetraphosphate, Up_4U) and presents a similar behaviour to the one observed for UTP or diadenosine polyphosphates (22). This substance enhanced tear secretion even after consecutive doses for several days as revealed by Schirmer scores. Tear secretion was increased 5-15 min after the compound application, and the effect persisted longer with solution of diquafosol of 8.5%. The clinical trials performed with humans with dry eye disease demonstrated good toleration in all the individuals at all the doses assayed. Applications of 25 μL of 0.5%, 1%, 2%, and 5% w/v produced increased tear secretion in patients with mild to moderate dry eye. All these results suggest the unequivocal utility of this compound as a therapeutic agent for dry eye syndrome (23).

In a model of dry eye developed in rats, the topical application of the dinucleotide Up_4U (diquafosol) increased tear secretion, surface health, and release of glycoproteins from goblet cells. These interesting properties of this dinucleotide indicate the therapeutic benefits of this compound for the treatment of dry eye (24).

Wound healing

The cornea is the most superficial part of the eye. This structure is suitable of having different damages coming from the

environmental medium. Foreign bodies, dirty or defective contact lenses and also refractive surgery, produce injury on the corneal epithelium, the most external part of the cornea.

The corneal wound healing process occurs in three main steps: a lag phase in which after the injury happens cells surrounding the affected area detach from Bowman's membrane and those cells which are affected by the injury are eliminated by polymorphonuclear leukocytes. A second step in which the cells in the periphery of the affected area move centripetally to cover the free space, and finally, a proliferative step in which cells divide to give the corneal epithelium its normal thickness.

Although all these stages are relevant, a critical step is the migration phase since it avoids the invasion of bacteria to inner parts of the eye, and other problems derived from an inadequate corneal thickness.

***In vivo* experiments**

We have investigated the possible effect of mono and dinucleotides on the corneal wound healing process. The presence of these substances in tears may suggest a role of them in the healing process, therefore it was evaluated the possible role of these compounds on corneal wound healing *in vivo* by means of New Zealand white rabbits which were injured with n-heptanol. In the absence of any added nucleotide (vehicle) the time of re-epithelialisation of a 3 mm corneal wound is of 32.2 hours and the rate of migration is 72.4 $\mu\text{m}/\text{hour}$. When the wounds are treated with 100 μM UTP or Ap_4A the rate of healing was accelerated to 121.6 $\mu\text{m}/\text{h}$ and 93.7 $\mu\text{m}/\text{h}$ respectively. None of the other mono or dinucleotides did significantly modify the rate of healing (25).

The positive effect of these two compounds is mediated by P2Y receptors and presumably P2Y₂ since UTP and Ap_4A are full agonists. Also, the application of antagonists such as suramin, PPADS or reactive blue 2, were able to reverse the effect produced by UTP and Ap_4A . Unfortunately due to the lack of more selective antagonists it was not possible to fully confirm the P2Y receptor subtype (25).

***In vitro* experiments**

In order to understand the molecular mechanism that make corneal epithelial cells to migrate faster after the challenge with some nucleotides and dinucleotides, experiments were performed with corneal epithelial cells in primary cultures (Figure 2A).

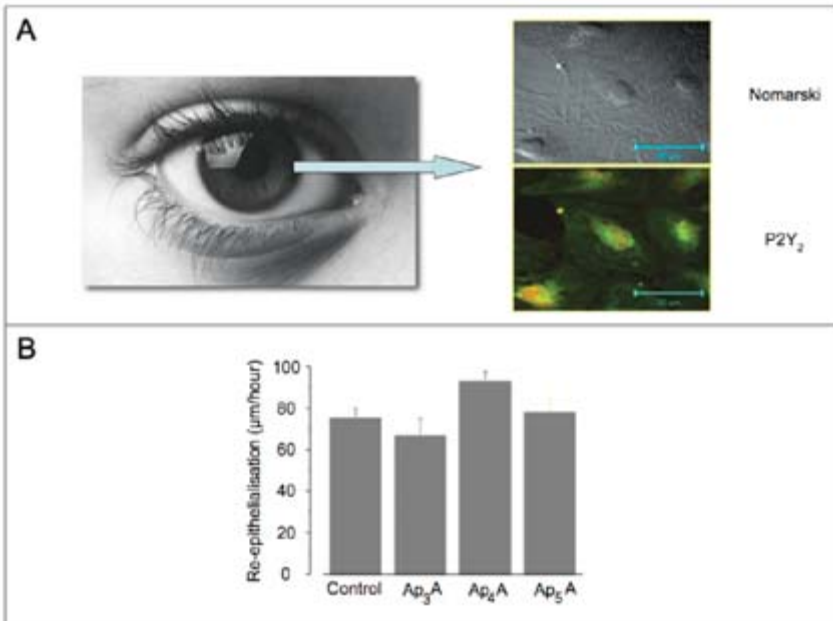


FIGURE 2. ***Effect of dinucleotides on corneal wound healing.*** **A.** Corneal epithelial cells were isolated and seeded as primary cultures which can be observed under Normarski optics and provide positive labelling to the P2Y₂ receptor antibody. **B.** Diadenosine polyphosphates were able modify the rate of re-epithelialization, Ap₄A being the best dinucleotide in its ability to accelerate cell migration.

The treatment of epithelial cells with diadenosine polyphosphates after scratching the monolayer with a pipette tip, demonstrated that as occur in vivo, Ap₄A was able to accelerate the rate of healing while Ap₃A and Ap₅A clearly delayed the rate of healing (Figure 2B). Other nucleotides, such as ADP did not modify the rate of healing when compared to control. In both cases, a positive or negative effect on

re-epithelialisation, the effects may be justified by the activation of different P2Y receptors subtypes, according to our pharmacological studies. It is clear that the pharmacology of P2 receptors is rather complicated due to the lack of selective antagonists. A possible picture of the receptors involved in the acceleration of re-epithelialisation or its delay is maybe possible by studying the behaviour of several purinergic agonists (26).

The increase in the rate of re-epithelialization has been observed when Ap_4A , and UTP were applied. This profile matches quite well with that described by Lazarowski et al. (27), in which Ap_4A and UTP are the best agonists on the cloned $P2Y_2$ receptor. A similar $P2Y_2$ profile has been previously described for corneal wound healing in the *in vivo* experiments described in the previous paragraph. With corneal epithelial cells in culture, it has been possible to detect some dinucleotides which clearly reduce the rate of healing. Together with the study of mononucleotides it was possible to obtain a profile for those nucleotides reducing the rate of re-epithelialisation. A profile with the ranking order $Ap_5A > Ap_3A \cong UDP$ suggests the involvement of a $P2Y_6$ receptor. This fact is altering the idea of the $P2Y_6$ receptor being a pyrimidinoceptor, sensitive to UTP and UDP. Nevertheless, studies performed with diadenosine polyphosphates and $P2Y_6$ receptors heterologously expressed in 1321N1 cells, demonstrate that both Ap_3A and Ap_5A are agonists of the $P2Y_6$ receptor although the concentration required for the receptor stimulation are higher than those of the best agonist, UDP (28). Also recently, the design of novel dinucleoside polyphosphates with uridine as nucleoside moiety (Up_nU), demonstrate that some of them are quite effective activating the $P2Y_6$ receptor (29).

The involvement of metabotropic P2 receptors in corneal wound healing has been reported by other groups (30-32). The presence of $P2Y_2$, $P2Y_4$ and $P2Y_{11}$, on corneal epithelial cells seem to be clear from a pharmacological point of view. Discussion arises when the presence of $P2Y_1$ or $P2Y_6$ is investigated. The assay of UDP together with the enzyme hexokinase suggests the presence of a $P2Y_6$ receptor in these cells (30).

Concerning the second messenger system underlying the activation of those receptors, it seems that both intracellular Ca^{2+}

mobilization (31, 32) the typical P2Y receptor second messenger system, and MAPKinase cascade activation³³ are involved. These intracellular mechanisms which accelerate the rate of healing, seems to be triggered by P2Y₂ and P2Y₄ membrane receptors (32). These results match well with the effect of Ap₄A, UTP and ATP we have observed in our investigation, which indicates the activation of a P2Y₂ receptor.

Ap₄A is effective inducing an increase in the rate of migration by stimulating a P2Y₂ receptor, while Ap₃A and Ap₅A do the opposite by activating a P2Y₆ receptor. This dual role of diadenosine polyphosphates may have a physiological meaning in the intact tissue. Corneal wound healing is a process that occurs in 3 main steps as previously commented: lag phase, migration and mitosis (33). It could be the case that in the intact corneal epithelium, P2Y₂ receptors would be the relevant ones facilitating the migration rate in intact corneas. It is necessary to take into consideration that in primary corneal epithelial cells in culture, the lag phase is reduced. This reduction is because the cells do not need to carry out some pathophysiological processes that occur in the intact cornea after injury. In the whole cornea, polymorphonuclear leukocytes remove necrotic cells from the wound margin. Also, hemidesmosomal attachments between the basement membrane and the basal cells disappear (33). All these phenomena does not occur in our preparation since it only contains a monolayer of epithelial cells.

On the other hand, P2Y₆ would be critical stopping migration and starting the third phase (mitosis). It is clear that we do not have any evidence for the role of P2Y₆ receptor to confirm this idea, but it would not be strange to think about P2Y₂ and P2Y₆ as switchers that control the transition from wound healing phase 2 to phase 3.

Nucleotides dinucleotides in the aqueous humour and the control of intraocular pressure

Aqueous humour is a physiologically relevant fluid that permits the nutrient supply to nonvascular structures such as the corneal endothelial cells and the lens. This fluid contains measurable amounts of both mono- and dinucleotides. The most relevant adenine

mononucleotides found in the whole aqueous humour were AMP, ADP, and ATP, which presented concentration values of 10.4 μM , 1.9 μM , and 1.0 μM , respectively (34). Investigations developed by Mitchell et al. (18) describe the concentration of ATP in the ciliary epithelium in particular in the immediate area where it is released. The concentration values for ATP were between 4 and 8 μM . The difference between both values may be as a consequence of either a dilution effect or due to the activity of ecto-nucleotidases (35). Diadenosine polyphosphates were also present in the aqueous humour of the rabbit, at lower concentrations than ATP, their values being 0.34 μM and 0.08 μM for Ap_4A and Ap_5A , respectively (34).

The presence of both mono and dinucleotides in the aqueous humour is suggesting a physiological role of these substances in the control of relevant processes such as intraocular pressure.

The control of intraocular pressure (IOP) is an important process where nucleotides may participate as therapeutic agents. Glaucoma is a pathology that, in many cases, is produced by an increase in the IOP. Pathophysiology of elevated IOP is linked either with the increased production of aqueous humour by ciliary body or an increased outflow resistance. This raise in IOP is transmitted to the retina, producing an occlusion of the posterior ciliary artery, generating ischaemic optic atrophy and gradual retinal degeneration. Moreover, the pressure can collapse optic nerve head structural support and axons can be damaged by mechanical compression. The final result of these complex negative actions is blindness (36).

IOP is a physiological process highly controlled by the nervous system. The sympathetic and parasympathetic nervous systems regulate both the production and drainage of aqueous humour. Part of the pharmacological treatments for ocular hypertension lie in the interference of either the synthesis of the aqueous humour (controlled by the sympathetic system) or of its removal (regulated by the parasympathetic). In this sense, many pharmacological approaches have tried to reduce IOP by altering the functioning of the innervation that controls the dynamics of aqueous humour. The use of beta-blockers in order to reduce the production of aqueous humour such as betaxolol or timolol is currently practised. Also, the application of cholinergic agonists such as carbamylcholine has been

used in order to reduce the resistance to aqueous outflow (37-39). Compounds that do not interfere with the nervous system have been used to reduce IOP. These include carbonic anhydrase inhibitors (decreasing aqueous production) or more recently the use of prostaglandin analogues such as latanoprost (Xalatan).

Until the year 2000, the only purines tested for their ability to modify IOP were adenosine and derivatives that demonstrated relevant physiological effects on IOP (40). Adenosine acting through adenosine A2 receptors produces an increase in IOP when topically applied to rabbit eyes, while A1 produce a decrease in IOP (41, 42).

The application of mono- and dinucleotides depicted a clear pattern of modulators on IOP. Thus, mononucleotides were classified under two main groups: on the one hand those elevating IOP and on the other those reducing it. Among the first, 2-MeSATP, ATP- γ -S and the natural compound ATP presented a clear increase on IOP, which was maximal 2-3 h after the compound instillation. This profile fits well with P2Y receptor pharmacology, although the destruction of these nucleotides by means of ectonucleotidases and the corresponding adenosine formation cannot be discarded (43). In this sense, a recent work by Farahbakhsh and Cilluffo (35) described the presence of P2Y₁ and P2Y₂ receptors in the rabbit ciliary body epithelial cells, which may be responsible for the action of 2-MeSATP, ATP- γ -S, as well as other P2Y agonists. On the contrary, $\beta\gamma$ -meATP and $\alpha\beta$ -meATP produced a clear and marked reduction in rabbit IOP. The time course to obtain the maximal effect was similar to the one obtained for the hypertensive compounds (3 h). Concentration-response analysis presented IC₅₀ values of 1.52 mg/mL and 0.55 mg/mL and a maximal reduction in IOP of 35.66% and 45.04% for $\alpha\beta$ -meATP and $\beta\gamma$ -meATP respectively. The hypotensive effect produced by these two mononucleotides were blocked by the P2 antagonist PPADS but were unaffected by the adenosine antagonists DPCPX (43). $\beta\gamma$ -meATP and $\alpha\beta$ -meATP, activate P2 receptors, presumably P2X₂ receptors, present in cholinergic terminals that are in the trabecular meshwork. The activation of this P2X₂ receptor would generate an increase in acetylcholine release, which facilitates both the relaxation of trabecular meshwork cells and the elimination of aqueous humour (Figure 3).

Diadenosine polyphosphates (Ap_nA) present a similar behaviour as that observed for mononucleotides. Of all the tested dinucleotides, Ap₃A and Ap₄A presented a clear reduction in IOP, with the others presenting a hypertensive effect. Ap₄A was a potent agonist and produced a decrease in intraocular pressure (29.6% of decrease), at concentrations 3 orders of magnitude below those at which Ap₂A, Ap₃A, or Ap₅A produced an increase. The dose-response curve for Ap₄A did not appear to inflect at the highest concentrations tested points at which activation of the excitatory receptor might be expected. At the lowest concentrations tested, none of Ap₂A, Ap₃A, and Ap₅A produced a decrease in intraocular pressure, which implies that in addition to there being two separate populations of receptors, one mediating an increase and the other a decrease in intraocular pressure, this latter receptor is specific for Ap₄A. It is possible that Ap₄A also activates the excitatory receptor, but in the mixed

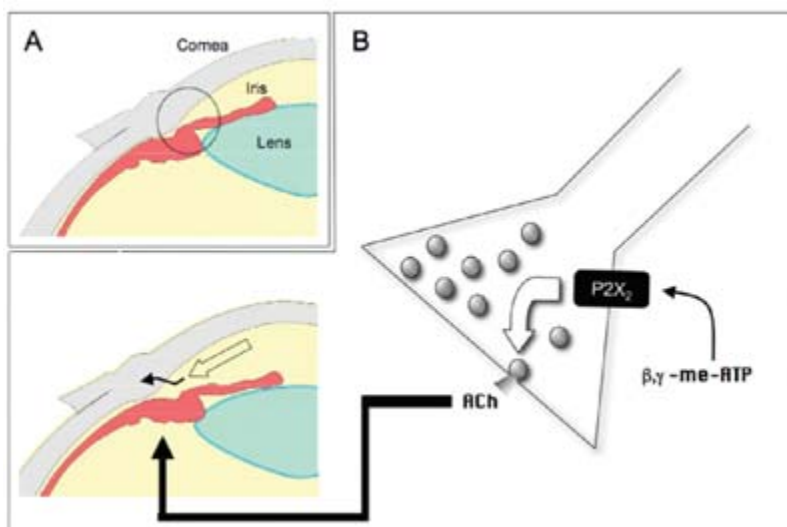


FIGURE 3. *Effect of nucleotides reducing IOP by acting on cholinergic terminals located in the ciliary muscle. A.* Under normal conditions the irido-corneal angle (inside the circle) permits the drainage of the aqueous humour through the trabeculum. *B.* P2X receptors present in cholinergic terminals from the parasympathetic nervous system innervating the ciliary processes can stimulate the release of more acetylcholine (ACh). This transmitter contracts the ciliary muscle that pulls the scleral spur opening the irido-corneal angle therefore reducing the hydrodynamic resistance of the aqueous humour.

population the effects of activation of the receptor that mediates a decrease in pressure predominated.

When investigating the place where Ap_4A exert its action and in clear contrast to what happen with mononucleotides, Ap_4A facilitates the drainage of the aqueous humour in the trabecular meshwork. This fact leads us to hypothesize that, at least in part, the hypotensive effect of Ap_4A in eyes is mediated by an increase in aqueous outflow (Figure 4). When instilled topically, dinucleotides are likely to stimulate purinergic receptors present in the trabecular meshwork to increase aqueous humour outflow as well as other purinergic receptors present in the eye, such as those in the ciliary. Nevertheless, the hypotensive effect of Ap_4A seems to be well correlated with the increase in outflow facility found here (44). By means of immunocytochemical and western blot techniques we have described the presence of $P2Y_1$, $P2Y_2$, and $P2Y_4$ in bovine trabecular meshwork cells. In contrast, the immunocytochemistry and Western blot results seem to clearly indicate the absence of $P2Y_6$ and $P2Y_{11}$ purinoceptors. Using the same antibodies, it was possible to identify these receptors in rat ocular structures such as the corneal epithelium ($P2Y_6$) and the retinal pigmented epithelium ($P2Y_{11}$) and to confirm the existence of $P2Y_1$ and $P2Y_2$ in sections containing the trabecular meshwork (44, 45). Other studies have also reported the presence of $P2Y_1$ and $P2Y_2$ receptors in bovine trabecular meshwork cells (46) and $P2Y_1$, $P2Y_4$, and $P2Y_{11}$ in a human trabecular meshwork cell line (47). Ap_nAs are known to activate several different purinergic receptors: Ap_3A and Ap_4A both activate $P2Y_1$ receptors with different selectivity, whereas Ap_5A is, in general, less effective at this receptor (48).

Furthermore, Ap_4A is a good agonist at $P2Y_2$ and $P2Y_4$ receptors, and although Ap_3A and Ap_5A can also activate these receptors, they do so with less affinity. $P2Y$ receptors act via a $Gq/11$ protein coupling to activate PLC, IP_3 formation, and mobilization of $[Ca^{2+}]_i$, although coupling to adenylyl cyclase, PLA2, PKC, NO synthase, or BKCa channels activation has also been described (1).

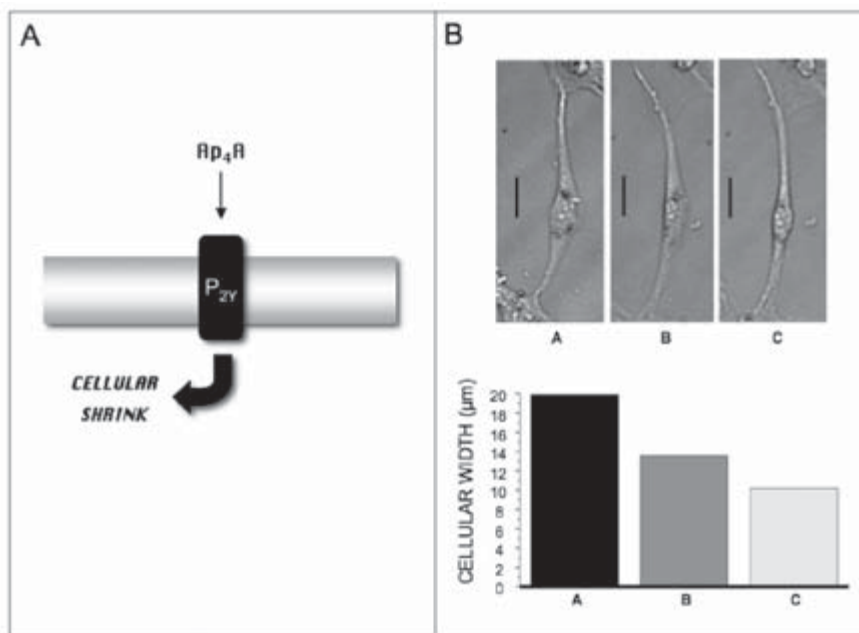


FIGURE 4. ***P_{2Y} receptors present in trabecular meshwork cells.*** **A.** *P_{2Y} receptors produce the shrink of trabecular meshwork cells this permitting the facilitation of the aqueous humour drainage.* **B.** *Visualization of a single trabecular meshwork cell in culture after being challenged with Ap₄A. It can be noticed how the cell shrinks after the superfusion of the dinucleotide.*

CONCLUDING REMARKS

The function of mono and dinucleotides in the eye indicates that these group of substances are developing interesting roles in three important ocular processes: tear production, wound healing and intraocular pressure. They are present in tears and in the aqueous humour, therefore indicating they are naturally activating and/or modulating these physiological processes. In addition, the topical administration of some of these compounds can rescue the eye from some pathological situations.

We are not so far away from finding any of these compounds in the pharmacy. Diquafosol, also termed Up₄U, has passed FDA requirements to soon appear in the USA market as a treatment for

dry eye condition. Other such as denufosol, aka dCp₄U, is on clinical trials. This dinucleotide is useful for the treatment of the retinal detachment since it reabsorbs the liquid that is accumulated between photoreceptors and the retinal pigmented epithelium. Following the same philosophy it will not be strange to see in the near future pharmaceutical compounds based on dinucleotides suitable for the treatment of ocular pathologies such as glaucoma, corneal wound healing or ocular surface infections.

REFERENCES

- (1) RALEVIC, V. and BURNSTOCK, G. (1998): Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492.
- (2) BURNSTOCK, G. (2005): Purinergic signalling: therapeutic potencial. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 71: 283-319.
- (3) HOLLOPETER, G.; JANTZEN, H. M.; VINCENT, D.; LI, G.; ENGLAND, L.; RAMAKRISHNAN, V.; YANG, R. B.; NURDEN, P.; JULIUS, D. and CONLEY, P. B. (2001): Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409: 202-207.
- (4) MARÍN-GARCÍA, P.; GÓMEZ-VILLAFUERTE, R. and GUALIX, J. (2005): Los receptores de nucleótidos P2Y reducen la entrada de calcio inducida por despolarización en terminales sinápticos de cerebro medio de rata. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 71: 659-672.
- (5) HERVÁS, C.; LEÓN, D.; SEN, R. P. and MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2005): Activación de la calcio calmodulina quinasa II, CaMKII, por el uridin nucleósido difosfato, UDP, en neuronas granulares de cerebelo. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 71: 439-449.
- (6) WEISMAN, G. A.; GONZÁLEZ, F. A.; ERB, L.; GARRAD, R. C. and TURNER, J. T. (1998): The cloning and expression of G-coupled P2Y nucleotide receptors. In: Turner JT, Weisman GA, Fedan JS, editors. *The P2 nucleotide receptors*. Totowa, NJ: Humana Press. p. 63-79.
- (7) COMMUNI, D.; GONZÁLEZ, N. S.; DETHREUX, M.; BREZILLION, S.; LANNON, V.; PARMENTIER, M. and BOEYNAEMS, J. M. (2001): Identification of a novel human ADP receptor coupled to Gi. *J. Biol. Chem.* 276: 41479-41485.
- (8) ZHANG, F. L.; LUO, L.; GUSTAFSON, E.; PALMER, K.; QIAO, X.; FAN, X.; YANG, S.; LAZ, T. M.; BAYNE, M. and MONSMA, F. (2002): P2Y13: identification and characterisation of a novel Gai-coupled ADP receptor from human and mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301: 705-713.
- (9) CHAMBERS, J. K.; MACDONALD, L. E., SARAU, H. M., AMES, R. S.; FREEMAN, K.; FOLEY, J. J., ZHU, Y.; McLAUGHLIN, M. M.; MURDOCK-McMILLAN, L.; TRILL, J.; SWIFT, A.; AIYAR, N.; TAYLOR, P.; VAWTER, L.; NAHEED, S.; SZEKERES, P.; HERVIEU, G.; SCOTT, C.; WATSON, J. M.; MURPHY, A. J.; DUZIC, E.; KLEIN, C.; BERGSMAN,

- WILSON, S. and LIVI, G. P. (2000): A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J. Biol. Chem.* 275: 10767-10771.
- (10) NORTH, R. A. and SURPRENANT, A. (2000): Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 563-580.
- (11) PINTOR, J.; PERAL, A.; INFANTES, J. J. and HERNÁNDEZ, F. (1999): ATP and adenosine: the forgotten transmitters in the eye. *Recent. Res Dev. Neurochem.* 2: 157-169.
- (12) PINTOR, J. (2000): Purinergic signalling in the eye. In: Burnstock, G., Sillito, A., editors. *Nervous control of the eye*. London: Harwood Academic Publishers. p. 171-210.
- (13) MIRAS-PORTUGAL, M. T.; GUALIX, J.; MATEO, J.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; CASTRO, E. and PINTOR, J. (1999): Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism. *Progr. Brain. Res.* 120: 397-409.
- (14) PINTOR, J.; PERAL, A.; HOYLE, C. H. V.; REDICK, C.; DOUGLASS, J.; SIMS, I. and YERXA, B. R. (2002a): Effects of diadenosine polyphosphates on tear secretion in New Zealand white rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300: 291-297.
- (15) PINTOR, J.; CARRACEDO, G.; ALONSO, M. C.; BAUTISTA, A. and PERAL, A. (2002b): Presence of diadenosine polyphosphates in human tears. *Pflugers. Arch. Eur. J. Physiol.* 443: 432-436.
- (16) PERAL, A.; CARACEDO, G.; ACOSTA, M. C.; GALLAR, J. and PINTOR, J. (2006): Increased levels of diadenosine polyphosphates in dry eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 4053-4058.
- (17) WILSON, P. D.; HOVATER, J. S.; CASEY, C. C.; FORTENBERRY, J. A. and SCHWIEBERT, E. M. (1999): ATP release mechanisms in primary cultures of epithelia derived from the cysts of polycystic kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 218-229.
- (18) MITCHELL, C. H.; CARRE, D. A.; MCGLINN, A. M.; STONE, R. and CIVAN, M. M. (1998): A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7174-7178.
- (19) LAZAROWSKI, E. R.; BOUCHER, R. C. and HARDEN, T. K. (2003): Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol. Pharmacol.* 64: 785-795.
- (20) ABRAHAM, E. H.; PRAT, A. G.; GERWECK, L.; SENEVERATNE, T.; ARCECI, R. J.; KRAMER, R.; GUIDOTTI, C. and CANTIELLO, H. F. (1993): The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 312-316.
- (21) GOMES, P.; SRINIVAS, S. P.; DRIESSCHE, W. V.; VEREECKE, J. and HIMPENS, B. (2005): ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 1208-1218.
- (22) YERXA, B. R.; ELENA, P. P.; CAILLAUD, T.; AMAR, T. and EVANS, R. (1999): INS365, a P2Y2 receptor agonist increases Schirmer scores in albino rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40: B723.
- (23) YERXA, B. R. (2001): Therapeutic use of nucleotides in respiratory and ophthalmic diseases. *Drug Dev. Res.* 52: 196-201.
- (24) FUJIHARA, T.; MURAKAMI, T.; FUJITA, H.; NAKAMURA, M. and NAKATA, K. (2001): Improvement of corneal barrier function by the P2Y(2) agonist INS365 in a rat dry eye model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 96-100.

- (25) PINTOR, J.; BAUTISTA, A.; CARRACEDO, G. and PERAL, A. (2004a): UTP and diadenosine tetraphosphate accelerate wound healing in the rabbit cornea. *Ophthalmic Physiol. Opt.* 24: 186-93.
- (26) MEDIERO, A.; PERAL, A. and PINTOR, J. (2006): Dual roles of diadenosine polyphosphates in corneal epithelial cell migration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 4500-4506.
- (27) LAZAROWSKI, E. R.; WATT, W. C.; STUTTS, M. J.; BOUCHER, R. C. and HARDEN, T. K. (1995): Pharmacological selectivity of the cloned human P2U₁ purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br. J. Pharmacol.* 116: 1619-1627.
- (28) PATEL, K.; BARNES, A.; CAMACHO, J.; PATERSON, C.; BOUGHTFLOWER, R.; COUSENS, D. and MARSHALL, F. (2001): Activity of diadenosine polyphosphates at P2Y receptors stably expressed in 1321N1 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 430: 203-210.
- (29) PENDERGAST, W.; YERXA, B. R.; DOUGLASS, J. G. 3RD; SHAVER S. R.; DOUGHERTY, R. W.; REDICK, C. C.; SIMS, I. F. and RIDEOUT, J. L. (2001): Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5'-polyphosphates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 157-160.
- (30) YANG, L.; CRASON, D. and TRINKAUS-RANDALL, V. (2004): Cellular injury induces activation of MAPK via P2Y receptors. *J. Cell. Biochem.* 91: 938-950.
- (31) KLEPEIS, V. E.; WEINGER, I.; KACZMAREK, E. and TRINKAUS-RANDALL, V. (2004): P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration. *J. Cell. Biochem.* 93: 1115-1133.
- (32) WEINGER, I.; KLEPEIS, V. E. and TRINKAUS-RANDALL, V. (2005): Tri-nucleotide receptors play a critical role in epithelial cell wound repair. *Purinergic Signalling* 1: 281-292.
- (33) STEELE, C. (2000): Corneal wound healing: a review. *Optometry Today.* 24: 28-32.
- (34) PINTOR, J.; PERAL, A.; NAVAS, B.; PELÁEZ, T.; MARTIN, S. and HOYLE, C. H. V. (2003): Presence of Diadenosine Polyphosphates in the Aqueous Humor: Their Effect on Intraocular Pressure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304: 342-348.
- (35) FARAHBAKHSH, N. A. and CILLUFFO, M. (2002): P2 purinergic receptor-coupled signaling in the rabbit ciliary body epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 2317-2325.
- (36) DAVSON, H. (1993): The aqueous humour and the intraocular pressure. In: *Physiology of the eye*, 5th edition. New York: Pergamon Press. p. 34-95.
- (37) ROHEN, J. (1964): Das Auge und seine Hilforgane. In: *Haut, Sinnersorgane, Mollendorff Bargmann*, editors. *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd III/2*. Berlin: Springer Verlag. p. 189-328.
- (38) KAUFMAN, P. L.; WIEDMAN, T. and ROBINSON, J. R. (1984): Cholinergics. In: *Sears, M. L., editor. Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer Verlag. p. 149-191.
- (39) LUTJEN-DRECOLL, J. and ROHEN, E. (1989): Morphology of the aqueous outflow pathways in normal and glaucomatous eyes. In: *Klein, E. A., editor. The glaucoma*. St. Louis: CV Mosby. p. 89-123.
- (40) CROSSON, C. E. and GRAY, T. (1994): Modulation of intraocular pressure by adenosine agonists. *J. Ocul. Pharmacol.* 10: 379-389.

- (41) CROSSON, C. E. (1995): Adenosine receptor activation modulates intraocular pressure in rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273: 320-326.
- (42) CROSSON, C. E. and GRAY, T. (1996): Characterization of ocular hipertensión induced by adenosine agonists. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 1833-1839.
- (43) PINTOR, J. and PERAL, A. (2001): Therapeutic potential of nucleotides in the eye. *Drug Dev. Res.* 52: 190-195.
- (44) SOTO, D.; PINTOR, J.; PERAL, A., GUAL, A. and GASULL, X. (2005): Effects of dinucleoside polyphosphates on trabecular meshwork cells and aqueous humor outflow facility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314: 1042-1051.
- (45) PINTOR, J.; SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J.; IRAZU, M.; MEDIERO, A.; PELÁEZ, T. and PERAL, A. (2004b): Immunolocalisation of P2Y receptors in the rat eye. *Purinergic Signalling* 1: 83-90.
- (46) CUI, M.; SRINIVAS, S. P.; MUTHARASAN, R.; SUN, X. C.; BONANNO, J. A. and YUE, B. Y. J. T. (2001): Mechanotransduction in cultured trabecular meshwork (TM) cells (Abstract). *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: S140.
- (47) CROSSON, C. E.; YATES, P. W.; BHAT, A. N.; MUKHIN, Y. V. and HUSAIN, S. (2004): Evidence form multiple P2Y receptors in trabecular meshwork cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309: 484-489.
- (48) SCHACHTER, J. B., LI, Q.; BOYER, J. L.; NICHOLAS, R. A. and HARDEN, T. K. (1996): Second Messenger cascade specificity and pharmacological selectivity of the human P2Y1-purinceptor. *Br. J. Pharmacol.* 118: 167-173.

————— *Artículo original* —————

Biosensor amperométrico para la medida de galactosa compuesto por microgeles de poliacrilamida

JUAN PABLO HERVÁS-PÉREZ¹, MARTA SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ², ENRIQUE LÓPEZ-CABARCOS²,
BEATRIZ LÓPEZ-RUIZ^{1*}

¹*Sección Departamental de Química Analítica. Facultad de Farmacia*

²*Departamento de Química-Física II. Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid*

RESUMEN

La galactosemia es uno de los errores innatos del metabolismo más frecuentes. Su presentación clínica en niños no tratados puede ser severa, a veces mortal; su diagnóstico es relativamente simple y su tratamiento es muy sencillo y efectivo. Esto ha hecho que en los últimos años se hayan propuesto nuevos diseños de biosensores para la determinación de galactosa basados en galactosa oxidasa. El objetivo del trabajo consistió en la inmovilización de galactosa oxidasa (GLOx) en micropartículas de poliacrilamida (PAA), sintetizadas a partir del método de emulsión concentrada, y su utilización como material biológico de un nuevo biosensor amperométrico para la determinación de galactosa. Para preparar los biosensores de galactosa se depositaron las micropartículas con galactosa oxidasa sobre la superficie de un electrodo de platino y se cubrieron con una membrana de diálisis. Las micropartículas se caracterizaron mediante un analizador de partículas Galai Cis-1, microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X y calorimetría de barrido diferencial. La temperatura de transición vítrea (T_g) de los microgeles de poliacrilamida disminuyó al encapsular en su interior galactosa oxidasa. Se estudió

* **Información de contacto:** Beatriz López-Ruiz.

Sección Departamental de Química Analítica. Facultad de Farmacia.

Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal, s/n. 28040 Madrid.

Teléfono: +34 913941756.

Fax: +34 913941751.

bealopru@farm.ucm.es

la influencia de distintos factores, tales como grado de reticulación, pH y temperatura en la respuesta del biosensor. Las condiciones óptimas se corresponden a un grado de reticulación del 7%, 40° C y pH 7,0. El sistema de inmovilización propuesto apenas modifica la actividad enzimática, pero parece proteger a la enzima aumentando el intervalo de temperatura en el que es activa.

Palabras clave: Emulsión concentrada.—Micropartículas.—Electrodo enzimático.—Galactosa oxidasa.

ABSTRACT

Amperometric biosensor based on polyacrylamide microgels for galactose determination

Galactosemia is one of the natural errors of the metabolism more frequent, its clinical representation in children not treated can be severe, sometimes mortal; its diagnostic is relatively simple and its treatment is very easy and effective. Hence, in last years new biosensors design for galactose determination based on galactose oxidase has been proposed. The aim of this work consists of the immobilization of galactose oxidase (GLOx) in polyacrylamide microparticles, using the concentrated emulsion method, and their use as biological material of a new amperometric biosensor for galactose determination. For preparing the galactose biosensors, microparticles with galactose oxidase were deposited on the surface of a platinum electrode and covered with a dialysis membrane. Microparticles were characterized by a Galai Cis-1 particle analyzer system, scanning electron microscopy, X-rays diffraction and differential scanning calorimetry. The presence of galactose oxidase decreases the transition temperature (Tg) of the polyacrylamide microgels. The influence of several experimental factors, such as crosslinking content, pH and temperature, on the biosensor response was investigated. The optimal performance of the biosensor takes place for a cross-linking of 7.0%, 40°C and pH 7.0. The proposed immobilization system almost does not modify the enzyme activity, but seems to protect to the enzyme because an increase of the temperature range in which the enzyme is active is observed.

Key words: Concentrated emulsion.—Microparticles.—Enzyme electrode.—Galactose oxidase.

INTRODUCCIÓN

Los biosensores amperométricos son dispositivos analíticos que presentan una gran aplicación en campos tales como la química clínica, la industria farmacéutica, la industria alimentaria, estudios medioambientales, etc. Su campo de aplicación está en expansión

gracias a algunas de sus propiedades como especificidad, selectividad, facilidad y rapidez de uso, intervalo de linealidad, posibilidad de miniaturización, bajo coste, etc. (1, 2, 3, 4). Los biosensores constan de un elemento biológico en íntimo contacto con un transductor responsable de la medida analítica. Para incrementar, a lo largo del tiempo, la estabilidad estructural y funcional del material biológico empleado en el diseño de biosensores, se emplean distintos métodos de inmovilización, que proporcionan un medio en el que el biomaterial se encuentra protegido. Uno de los sistemas de inmovilización más utilizados consiste en la encapsulación del material biológico dentro de una matriz polimérica (5, 6). A modo de ejemplo, la glucosa oxidasa se ha inmovilizado, con éxito, en electropolímeros (7, 8), hidrogeles (9, 10) y más recientemente en látex (11). En cuanto a la galactosa oxidasa se ha inmovilizado en electropolímeros (12, 13, 14), en diferentes películas poliméricas (15, 16, 17) e hidrogeles (18, 19). Una de las principales aplicaciones de los biosensores compuestos por galactosa oxidasa es el estudio del nivel de galactosa en sangre, ya que este parámetro tiene una gran importancia en química clínica para el análisis preventivo de la galactosemia, patología metabólica en los recién nacidos. La galactosemia es una enfermedad en la cual la ausencia de la enzima galactosa fosfatouridil transferasa produce la incapacidad de utilizar el azúcar simple galactosa, que compone la mitad de la lactosa, el azúcar que se encuentra en la leche, esto provoca una acumulación de galactosa dentro del organismo, y como consecuencia la aparición de lesiones en el hígado y en el sistema nervioso central.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Acrilamida, NN'-metilen-bis-acrilamida, galactosa y galactosa oxidasa (GLOx) (E.C.1.1.3.9) de *Dactylium dendroxides* con una actividad de 14UI/mg de sólido fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El persulfato de amonio (PSA), Span 80, NNN'N'-tetra-metil-etilen-diamina (TEMED) y dodecano por Fluka (Buchs, Switzerland). La membrana de diálisis con un corte de peso molecular (MWCO) comprendido entre 12.000 y 14.000 daltons por

Spectrum Medical Industries. Todos los reactivos fueron usados tal y como se recibieron. El agua utilizada fue de calidad Milli Q (Millipore, Milford, MA, USA).

Aparatos

Para el estudio morfológico de las micropartículas se utilizó un microscopio electrónico de barrido JOEL, modelo JSM-6400, que opera a 20KV y una magnificación de 5000. Con el analizador Galai Cis-1 se realizó el estudio del tamaño de las partículas. Los difractogramas se obtuvieron con un difractor Philips X'Pert modelo PW3050. Las medidas de calorimetría se llevaron a cabo con un calorímetro diferencial programado Mettler modelo 820. Para las medidas amperométricas se utilizó un potenciómetro Metrohm modelo E-506 (Herisau, Switzerland), con una celda electroquímica termostatazada compuesta por tres electrodos; un electrodo de referencia (electrodo de calomelanos saturado), un electrodo auxiliar de barra de platino y un electrodo de trabajo de platino.

Síntesis de microgeles

La preparación de las micropartículas con galactosa oxidasa se realizó mediante el método de polimerización desde emulsión concentrada (20), siendo la fracción máxima de volumen $\Phi = 0,86$. Para estabilizar la emulsión W/O se utilizó el tensoactivo Span 80 (monooleato de sorbitol), con un coeficiente hidrofilia-lipofilia (HLB) de 4,3. El Span 80, junto con el dodecano, forma la fase oleosa. La fase acuosa está formada por una disolución reguladora de fosfato sódico 0,1M, pH 6,0, el monómero (acrilamida), el agente reticulante (NN'-metilen-bis-acrilamida) y el agente iniciador (PSA). Con el fin de eliminar el O₂ disuelto se pasó una corriente de N₂, tanto por la fase acuosa como por la fase oleosa. La formación de la emulsión concentrada se llevó a cabo mediante la inyección de la fase acuosa gota a gota sobre la fase oleosa. Este proceso se realizó bajo agitación magnética constante, obteniéndose finalmente una emulsión con aspecto lechoso. Una vez obtenida la emulsión se procedió a la polimerización, proceso que fue acelerado mediante la adición

de TEMED. El sistema se mantuvo bajo agitación continua durante 60 minutos, tiempo adecuado para completar la reacción de polimerización. Se procedió a la extracción de las micropartículas utilizando en primer lugar una disolución reguladora de fosfato sódico 0,1M frío, pH 6,0. El precipitado obtenido se lavó con acetona, y se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 15 minutos, obteniéndose un producto sólido, que se liofilizó durante 24 horas. Las micropartículas así obtenidas se conservaron a -4° C.

TABLA 1. *Composición detallada de las fases acuosa y oleosa de la emulsión precursora*

	$\eta = 6\%$	$\eta = 6,5\%$	$\eta = 7\%$	$\eta = 7,5\%$	$\eta = 8\%$
FASE EXTERNA (oleosa)					
Dodecano	450 μ l	450 μ l	450 μ l	450 μ l	450 μ l
Span 80	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l
FASE INTERNA (acuosa)					
Acrilamida	750 mg	750 mg	750 mg	750 mg	750 mg
Bisacrilamida	45 mg	48,75 mg	52,5 mg	56,25 mg	60 mg
Disolución tampón pH 7,0	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
PSA	9 mg	9 mg	9 mg	9 mg	9 mg
Enzima GlOx (14 UI/mg)	53,6 mg	53,6 mg	53,6 mg	53,6 mg	53,6 mg
TEMED	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l

El tamaño de poro de la matriz polimérica reticulada obtenida está determinado por la relación entre la cantidad de agente reticulante y la de monómero. La fracción de agente reticulante (grado de reticulación) en tanto por ciento viene dada por la expresión:

$$\eta = \frac{AR(g)}{AR(g) + M(g)} \times 100$$

donde AR es la cantidad de agente reticulante y M la cantidad de monómero expresadas ambas en gramos.

En la Tabla 1 se muestra la composición de las fases precursoras de la emulsión de poliacrilamida utilizada en la encapsulación de GLOx para cada grado de reticulación.

Preparación del biosensor amperométrico

El biosensor propuesto consta de dos partes: el transductor, formado por un electrodo de platino y el componente biológico, GLOx inmovilizada en el interior de las micropartículas de poliacrilamida. Una cantidad exactamente pesada (3 mg) de estas micropartículas se pone en contacto con la superficie electródica, formando así una película uniforme alrededor de la misma. Mediante una membrana de diálisis de MWCO 12.000-14.000 D, las micropartículas se retienen en la superficie del electrodo de platino de forma que se permite el paso de la galactosa a través de sus poros. Un esquema de dicho biosensor se muestra en la Figura 1.

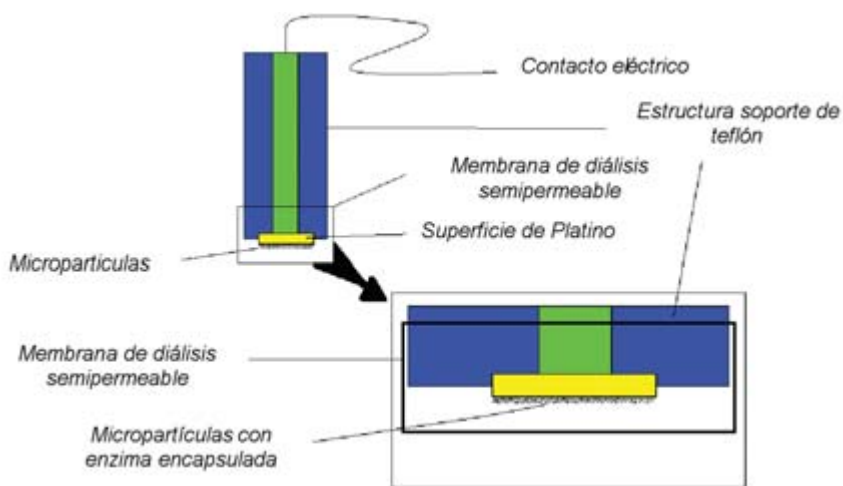


FIGURA 1. *Diseño del sensor amperométrico.*

RESULTADOS

Caracterización de las micropartículas con microscopía electrónica de barrido

En la Figura 2 se muestra la micrografía de micropartículas de poliacrilamida de grado de reticulación 7%, con GLOx en su interior.

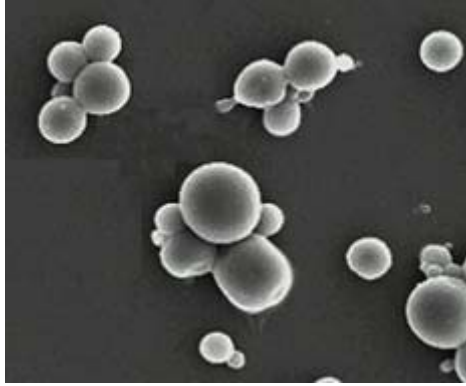


FIGURA 2. *Micrografía de micropartículas de poliacrilamida con GLOx, $\eta = 7\%$.*

Caracterización de las micropartículas con GALAI CIS-1

El estudio de tamaño de las micropartículas en agua se realizó mediante un analizador de tamaños Galai Cis-1. En la Figura 3 se representa la distribución de tamaños obtenida.

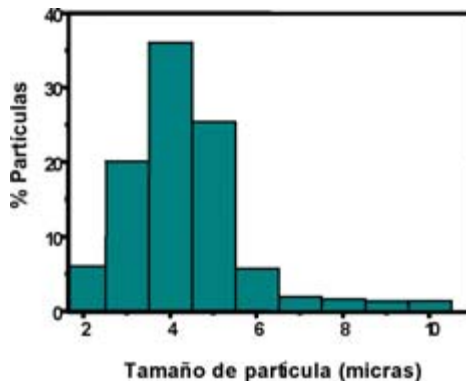


FIGURA 3. *Distribución de tamaños de las micropartículas en agua.*

Estudio de la temperatura de transición vítrea (T_g), del microgel

Además del tamaño de poro, otras propiedades del polímero, como la temperatura de transición vítrea (T_g), también se ven modificadas con la concentración de agente reticulante (20).

Este estudio se realizó mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC). Para ello se tomaron micropartículas liofilizadas y se calentaron a 120°C durante 10 minutos. El contenido de agente entrecruzante de las micropartículas estudiadas varió entre 6% y 8%, próximo al valor óptimo para la inmovilización del enzima. La Figura 4a muestra el termograma obtenido con 4 mg de micropartículas de poli(acrilamida) (PAAm) con GlOx de $\eta = 7\%$, al someterlas a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. En la Figura 4b se observa la relación entre T_g y el contenido de entrecruzante.

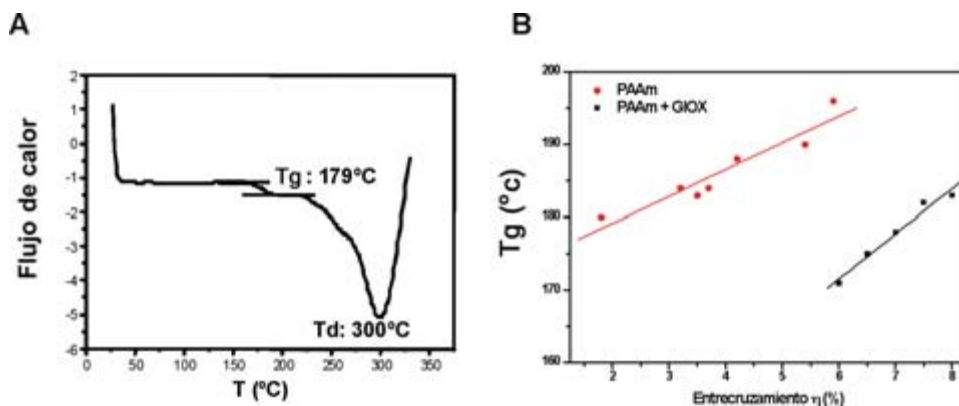


FIGURA 4. (A) *Termograma obtenido con micropartículas de poli(acrilamida) con GlOx $\eta = 7\%$. Velocidad de calentamiento $10^\circ\text{C}/\text{min}$., peso muestra 4 mg.* (B) *Efecto del grado de reticulación en la temperatura de transición vítrea del microgel con y sin GlOx.*

Difracción de rayos X

En la Figura 5 se muestra el difractograma obtenido con micropartículas de GlOx de $\eta = 7\%$. El espaciado d , correspondiente a estas reflexiones, se ha calculado utilizando la fórmula de Bragg.

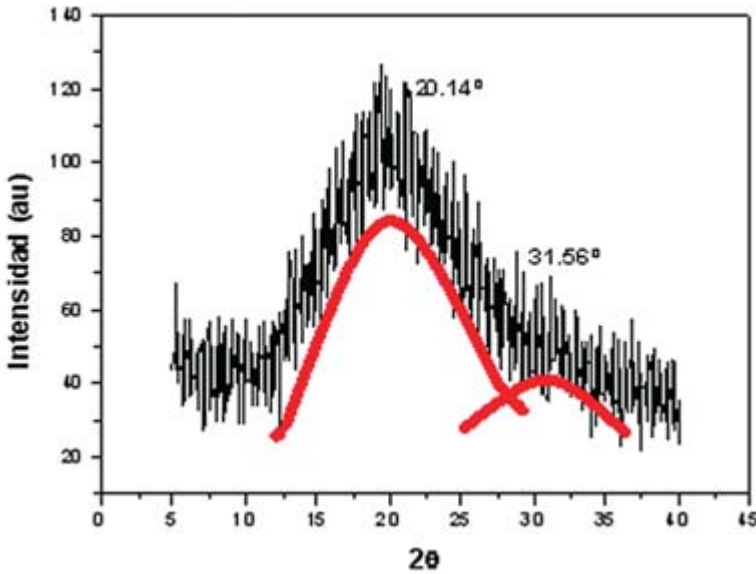
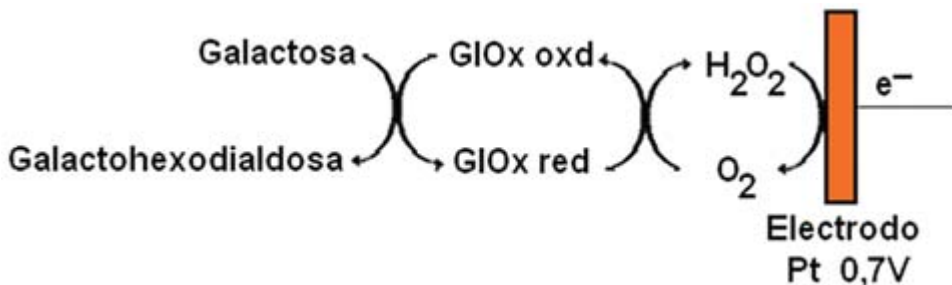


FIGURA 5. *Difractograma correspondiente a micropartículas de PAA con GIOx, $\eta = 7\%$.*

Diseño de un biosensor para la determinación de galactosa

Como se muestra en el siguiente esquema, al reaccionar la galactosa con la galactosa oxidasa se genera peróxido de hidrógeno que se oxida en el electrodo a un potencial de +0,7 V vs ECS, dando lugar a una corriente eléctrica que es proporcional a la concentración de galactosa en la disolución. En la Figura 6 se muestra el incremento y perfil de corriente producido al añadir galactosa a la disolución de tampón fosfato.



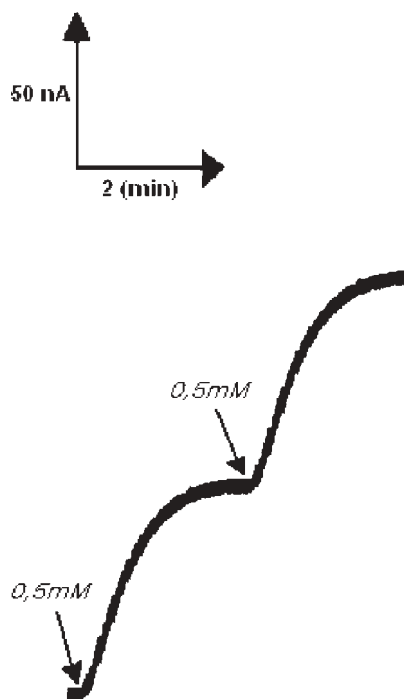


FIGURA 6. *Respuesta del biosensor a una concentración de galactosa 0,5 mM.*

Influencia del grado de reticulación de las micropartículas poliméricas

Para realizar este estudio se utilizaron micropartículas con distintos grados de reticulación (6; 6,5; 7; 7,5 y 8%). Se prepararon cinco biosensores con las diferentes micropartículas tomando en cada caso 3 mg de micropartículas. Se examinó la respuesta de estos biosensores en función de la concentración de galactosa añadida hasta llegar a la concentración de galactosa correspondiente a la saturación enzimática. Las adiciones de galactosa se realizaron sobre una disolución tampón de fosfato sódico 0,1M pH 6,0 y las medidas se llevaron a cabo a 25° C y + 0,7 V vs. ECS. En la Figura 7 se muestran las curvas de calibrado obtenidas con biosensores fabricados por micropartículas de distintos grados de reticulación. En la Tabla 2 se muestran las propiedades analíticas de dichos biosensores.

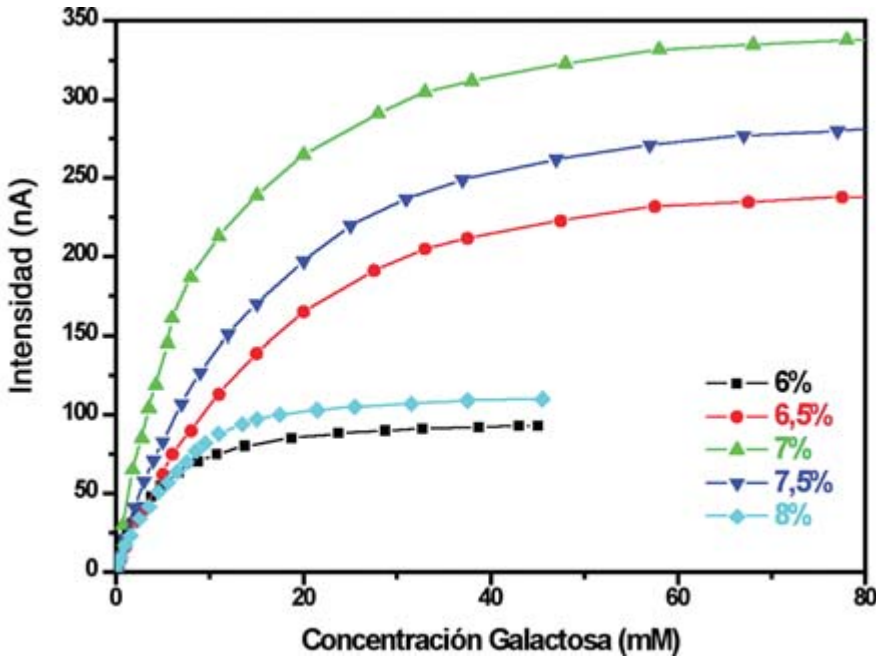


FIGURA 7. *Curvas de calibrado de los biosensores de galactosa para los distintos grados de reticulación. Condiciones experimentales: pH 6,0, 25° C y +0,7 V vs. ECS.*

Para comprobar si la reacción global del biosensor obedece a una cinética del tipo Michaelis-Menten se calculó el índice de Hill (n) a partir de la ecuación de Hill (21):

$$\log \left[\left(\frac{i_{m\acute{a}x}}{i} \right) - 1 \right] = \log Km_{app} - n \log [S] \quad \text{Ecuación 1}$$

donde n es el grado de desviación de la reacción del biosensor de la cinética de Michaelis-Menten, de modo que cuanto más se desvíe dicho parámetro de la unidad menos se ajustará la cinética de la reacción global a una cinética de Michaelis-Menten.

En la Tabla 3 se recogen los valores del índice de Hill obtenidos para los distintos grados de reticulación.

TABLA 2. *Propiedades analíticas de los biosensores preparados con microgeles de distintos grados de reticulación*

η (%)	Sensibilidad ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Rango lineal (M)	r (n)	Límite de detección (M)
6,0	0,12	1,33	$1,0 \cdot 10^{-3} - 5,0 \cdot 10^{-3}$	0,9914 (6)	$5 \cdot 10^{-4}$
6,5	0,16	3,29	$1,0 \cdot 10^{-3} - 6,0 \cdot 10^{-3}$	0,9940 (5)	$5 \cdot 10^{-4}$
7,0	0,30	4,83	$7,5 \cdot 10^{-4} - 8,0 \cdot 10^{-3}$	0,9955 (8)	$9 \cdot 10^{-4}$
7,5	0,17	4,09	$2,0 \cdot 10^{-3} - 9,0 \cdot 10^{-3}$	0,9936 (6)	$4 \cdot 10^{-4}$
8,0	0,10	1,57	$2,5 \cdot 10^{-3} - 8,5 \cdot 10^{-3}$	0,9960 (7)	$5 \cdot 10^{-4}$

TABLA 3. *Parámetros cinéticos de los biosensores formados por microgeles con distintos entrecruzamientos*

η (%)	Coefficiente de Hill	$K_{\text{m,app}}$ (mM)
6,0	1,03	7,03
6,5	1,04	6,96
7,0	1,05	4,82
7,5	1,14	5,31
8,0	1,20	5,61

El cálculo de la K_m se realizó a partir de las correspondientes representaciones de Lineweaver-Burk (22), utilizando los datos de la intensidad de corriente medida en el estado estacionario para sucesivas adiciones de sustrato hasta no obtener variación apreciable de la intensidad de corriente.

Influencia del pH

Este estudio se realizó con una disolución tampón acetato/fosfato de sodio 0,1M para el intervalo de pHs comprendido entre 4,0 y 8,0.

Respecto a las demás condiciones experimentales, se tomaron 3 mg de micropartículas con grado de reticulación $\eta = 7\%$, realizándose las medidas a 25°C y a $+0,7\text{ V vs. ECS}$. En la Figura 8 se muestra la variación de la respuesta máxima relativa en función del pH.

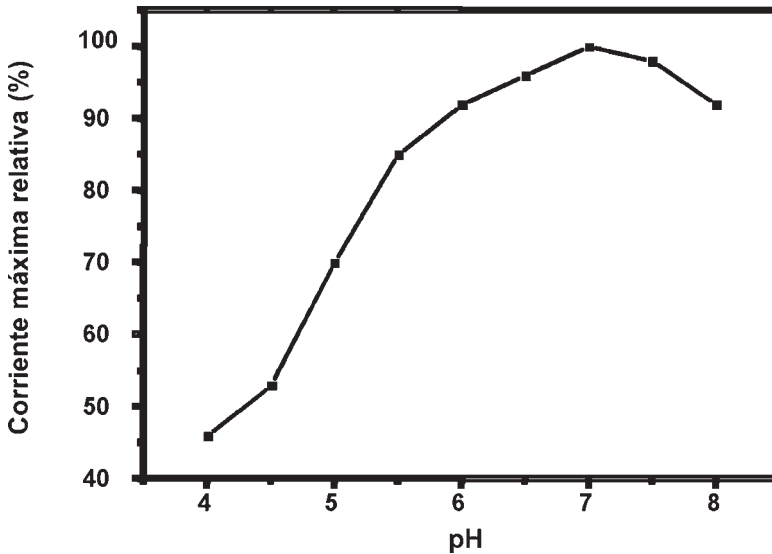
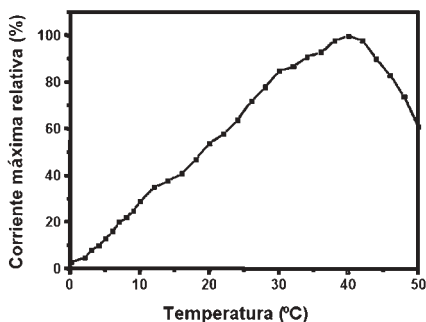


FIGURA 8. *Efecto del pH en la respuesta del biosensor. Condiciones experimentales: 0,1M galactosa, 25°C y $+0,7\text{ V vs. ECS}$.*

Influencia de la temperatura

El estudio de la temperatura se realizó utilizando una celda electroquímica termostatazada. Para la preparación del biosensor se tomaron 3 mg de micropartículas de grado de reticulación $\eta = 7\%$; las adiciones de galactosa se realizaron sobre una disolución tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7, y las medidas se hicieron a un potencial de $+0,7\text{V vs. ECS}$ (Figura 9a). En la Figura 9b se muestra la curva de Arrhenius.

A



B

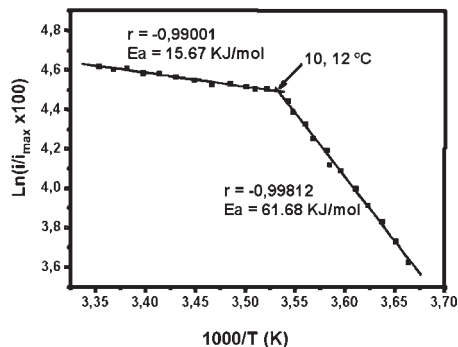


FIGURA 9. (A) Efecto de la temperatura en la respuesta del biosensor. (B) Curva de Arrhenius del biosensor elaborado con microgeles de $\eta = 7\%$. Condiciones experimentales: 0,1 M galactosa, pH 7 y + 0,7 V vs. ECS.

DISCUSIÓN

El estudio se inició con la caracterización de los microgeles usados como sistema de inmovilización de la GLOx, con el objetivo de investigar el efecto de incluir el enzima en el interior de una matriz polimérica en la estructura de dicha matriz.

Las micropartículas presentan forma esférica y gran polidispersidad, el 80% de ellas muestran un tamaño comprendido entre 3 y 5 micras.

La transición vítrea aparece en los polímeros amorfos y existe el criterio de que cualquier factor que dificulte la movilidad molecular de la cadena polimérica tiende a incrementar la Tg. Por ejemplo, el aumento de las fuerzas intermoleculares y del peso molecular del polímero, la rigidez y tamaño de las ramas y grupos laterales y también el aumento del grado de entrecruzamiento son factores que hacen que la Tg aumente.

En la Figura 4a se pueden ver con claridad dos procesos térmicos entre 20° C y 350° C. Primero se observa un salto en la capacidad calorífica a 179° C correspondiente a la transición vítrea del polímero seguido por un pico endotérmico alrededor de 300° C que se asocia con la descomposición del microgel.

Como era de esperar, se observa una dependencia lineal de la Tg con el grado de reticulación, ya que, aunque esta relación depende de varios factores como el número de moléculas entrecruzantes por gramo de monómero y el peso molecular del polímero (23), para contenidos de agente entrecruzante no muy grandes se puede aproximar a una relación lineal (24).

La Tg aumenta de forma lineal al aumentar el contenido de agente reticulante en el intervalo estudiado (Figura 4b) tanto en los microgeles vacíos como en los que contienen GLOx. Este cambio se puede describir por las siguientes expresiones:

$$\text{Micropartículas vacías: } T (^{\circ}\text{C}) = 171,9 + 3,9 \eta (\%)$$

$$\text{Micropartículas con GLOx: } T (^{\circ}\text{C}) = 169,9 + 6,9 \eta (\%)$$

Asimismo en la Figura 4b se observa como la Tg de las micropartículas de poliacrilamida sin enzima con distintos grados de reticulación (20) es siempre mayor que para aquellas micropartículas que poseen en su interior la enzima GLOx inmovilizada, al igual que ocurría con las micropartículas de PAA con glucosa oxidasa (20), aunque en este caso (GOx) el descenso observado en la Tg fue mayor, probablemente debido al mayor tamaño de la enzima.

Referente al estudio de las micropartículas mediante difracción de rayos X, se observan dos máximos anchos que son característicos de estructuras amorfas y que aparecen en este caso centrados alrededor de las posiciones $2\theta_1 = 20,14$ grados y $2\theta_2 = 31,56$ grados. Los valores medios de los espaciados obtenidos fueron $d_1 = 4,6$ Å y $d_2 = 2,98$ Å. No se observa ningún cambio de los espaciados al variar el contenido de agente entrecruzante, sólo pequeñas fluctuaciones que se atribuyen a las heterogeneidades que se forman dentro de los microgeles durante el proceso de polimerización, que son difíciles de reproducir. Glans y Turner (25) encontraron un valor de espaciado, en microgeles de PAA, de $4,15$ Å y observaron un aumento de este valor hasta $4,42$ Å al calentar el microgel. Por tanto, este espaciado d_1 parece corresponder con la distancia entre cadenas poliméricas. Por el contrario, el espaciado d_2 no se observa en microgeles sin enzima, por lo que pensamos debe estar relacionado con la presencia de galactosa oxidasa dentro del microgel y se corresponde con alguna característica estructural de la enzima.

El grado de reticulación permite establecer el valor óptimo al cual la enzima queda retenida sin que se vea afectada la difusión del sustrato (galactosa) hacia el interior de la micropartícula, permitiendo la reacción enzimática. La máxima respuesta se alcanza con 7%, este grado de reticulación da lugar a micropartículas en las que toda la enzima se retiene, hipótesis que se corroboró al no observar actividad enzimática en el líquido sobrenadante de lavado. Grados de reticulación menores dieron lugar a menores corrientes. Este resultado se explicaría si consideramos que cuando el grado de reticulación fue 6,5%, el microgel formado presenta un poro lo suficientemente grande como para que la enzima pueda atravesarlo, interpretación que quedó confirmada con la aparición de actividad enzimática en el líquido sobrenadante. Aún es mayor la pérdida para un grado de reticulación $\eta = 6\%$, y así se observa en la Figura 8, con un descenso apreciable en la corriente máxima. Cuando los valores son mayores que el óptimo, el descenso de la intensidad medida por el biosensor no se debería a una pérdida de enzima, sino a que la matriz generada es tan densa y el tamaño de poro es tan pequeño que además de ralentizar el acceso del sustrato a la micropartícula podría dificultar el contacto entre el sustrato y los centros activos del enzima. De acuerdo con estos resultados, los siguientes experimentos se realizaron con micropartículas de grado de reticulación 7%.

Como puede verse en la Tabla 3, los valores de índice de Hill obtenidos están muy próximos a la unidad para grados de reticulación de 6%, 6,5% y 7%, lo que nos indican que, en estos casos, la reacción global del biosensor se ajusta bastante a la cinética enzimática de Michaelis-Menten, y parece indicar que es la reacción enzimática la limitante frente a la difusión del sustrato a la superficie enzimática a través del microgel. En los casos en los que el valor de índice de Hill es significativamente superior a 1 (para grados de entrecruzamiento 7,5% y 8%) la etapa limitante de la reacción global del biosensor parece ser la difusión del sustrato, como era de esperar, ya que para esos grados de reticulación la matriz polimérica es tan densa que dificulta el movimiento del mismo.

Al estudiar el efecto del pH en la corriente generada en el biosensor se obtuvo la máxima respuesta a pH 7,0. Este valor de pH observado al inmovilizar la GlOx en micropartículas de poliacrilamida

coincide con el observado en otros sistemas de inmovilización enzimática propuestos por distintos autores (16, 26, 27).

Como muestra la Figura 9a, la máxima actividad enzimática se produce a una temperatura de 40° C y el intervalo donde la respuesta relativa es superior al 90% se sitúa entre 32 y 42° C. A partir de 42° C la actividad enzimática relativa disminuye, debido a que la GLOx comienza a desnaturalizarse. Según los valores encontrados en la literatura, Tressel et Kosman (28) encontraron la máxima actividad de la GLOx en disolución a 25° C, mientras que Gülce y colaboradores la sitúan en 35° C, disminuyendo cuando la temperatura supera 40° C (14). Según nuestros resultados, la desnaturalización de la enzima inmovilizada comienza a 40° C, temperatura superior a la que presenta esta enzima en disolución, lo que indica un efecto protector de la matriz del polímero en la actividad de la enzima.

En la curva de Arrhenius se observan dos tramos lineales. Las energías de activación (E_a) obtenidas a partir de las pendientes de dichas rectas fueron 15,7 KJ/mol y 61,9 KJ/mol. Las rectas se cortan a una temperatura de 10,12° C. Según las curvas de Arrhenius obtenidas con esta misma matriz polimérica al encapsular la enzima glucosa oxidasa y tirosinasa (29, 30), el cambio en la energía de activación observado a 10,12° C parece estar relacionado no tanto con cambios conformacionales del enzima con la temperatura, como aseguran algunos autores (31), sino a un cambio en el entorno del enzima y en concreto a cambios en el medio polimérico. La temperatura de cambio parece tener relación con la transición de volumen del polímero.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación de este trabajo a través del proyecto MAT2003-03051-C0303. Agradecer también a A. Rodríguez (Centro de Microscopía Electrónica, UCM) y Ester Gil Alegre (Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica) por su apoyo técnico y profesional.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) KULAGINA, N. V.; SHANKAR, L., MICHAEL, A. C. (1999): Monitoring glutamate and ascorbate in the extracellular space of brain tissue with electrochemical microsensors. *Anal. Chem.* 15: 5093-5100.
- (2) GUERRIERI, A., PALMISANO, F. (2001): An Acetylcholinesterase/Choline Oxidase-Based Amperometric Biosensor as a Liquid Chromatography Detector for Acetylcholine and Choline Determination in Brain Tissue Homogenates. *Anal. Chem.* 73: 2875-2882.
- (3) CRESPI, F. (2002): *In vivo* voltammetry and concomitant electrophysiology at a single micro-biosensor to analyse ischaemia, depression and drug dependence. *J. Neur. Met.*, 119: 173-184.
- (4) MOSER, I.; JOBST, G., URBAN, G. A. (2002): Biosensor arrays for simultaneous measurement of glucose, lactate, glutamate, and glutamine. *Biosens. Bioelectron.* 17: 297-302.
- (5) BENAS, B.; BENOIT, M. A., POULINE, O. (2000): Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers. *Vaccine.* 18: 1495-1505.
- (6) HILDEBRAND, G. E., TACK, J. W. (2000): Microencapsulation of peptides and proteins. *I. J. Pharm.* 196: 173-176.
- (7) COSNIER, S. (1999): Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. *Biosens. Bioelectron.* 14: 443-456.
- (8) ADELOJU, S. B., MOLINE, A. N. (2001): Fabrication of ultra-thin polypyrrole-glucose oxidase film from supporting electrolyte-free monomer solution for potentiometric biosensing of glucose. *Biosens. Bioelectron.* 16: 133-139.
- (9) BLANDINO, A.; MACIAS, M., CANTERO, D. (2001): Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules *Proc. Biochem.* 36: 601-606.
- (10) CALVO, E. J.; ETCHENIQUE, R.; PIETRASANTA, L.; WOLOSUK, A. DANILOWICZ, C. (2001): Layer-by-layer self-assembly of glucose oxidase and Os(Bpy)(2)CIP y CH₂NH-poly(allylamine) bioelectrode. *Anal. Chem.* 73: 1161-1168.
- (11) COSNIER, S.; SZUNERITS, S.; MARKS, R. S.; NOVOA, A.; PUECH, L.; PEREZ, E., RICO-LATTES, I. (2001): A comparative physical study of two different hydrophilic synthetic latex matrices for the construction of a glucose biosensor. *Talanta.* 55: 889-897.
- (12) MANOWITZ, P.; STOECKER, P. W., YACYNICH, A. M. (1995): Galactose biosensors using composite polymers to prevent interferences. *Biosens. Bioelectron.* 10: 359-370
- (13) COCHE-GUERENTE, L.; COSNIER, S.; INNOCENT, C., MAILLEY, P. (1995): Development of amperometric biosensors based on the immobilization of enzymes in polymer films electrogenerated from a series of amphiphilic pyrrole derivatives. *Anal. Chim. Acta.* 311: 23-30.
- (14) GÜLCE, H.; ATAMAN, I.; GÜLCE, A., YILDIZ, A. (2002): A new amperometric enzyme electrode for galactose determination. *Enz. and Microb. Tech.* 30: 41-44.
- (15) SHARMA, S. K.; SINGHAL, R.; MALHOTRA, B. D.; SEHGAL, N., KUMAR, A. (2004): Lactose biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene). *Biosens. Bioelectron.* 20: 651-657.

- (16) SHARMA, S. K.; SINGHAL, R.; MALHOTRA, B. D.; SEHGAL, N., KUMAR, A. (2004): Langmuir-Blodgett film based biosensor for estimation of galactose in milk. *Electrochim. Acta.* 49: 2479-2485.
- (17) EKINCI, E., PAŞAHAN, A. (2004): Poly (4-methoxyphenol) film as a galactose-sensing material. *Eur. Pol. J.* 40: 1605-1608.
- (18) YANG, Y.; MU, S., CHEN, H. (1998): Electrochemical synthesis of polypyrrole for the immobilization of galactose oxidase. *Synth. Metals.* 92: 173-178.
- (19) BRAHIM, S.; NARINESINGH, D., GUISEPPI-ELI, A. (2002): Bio-smart hydrogels: co-joined molecular recognition and signal transduction in biosensor fabrication and drug delivery. *Biosens. Bioelectron.* 17: 53-59.
- (20) RUBIO, RETAMA, B. J.; LÓPEZ-CABARCOS, E. J., LÓPEZ-RUIZ, B. (2003): Microstructural modifications induced by the entrapped glucose oxidase in cross-linked polyacrylamide microgels used as glucose sensors. *Biomaterials.* 24: 2965-2973.
- (21) IWUOHA, E. I.; ADEYOJU, O.; DEMPSEY, E., SMUTH, M. R. (1995): Investigation of the effects of polar organic solvents on the activity of tyrosinase entrapped in a poly(ester-sulphonic acid) polymer. *Biosens. Bioelectron.* 10: 661-667.
- (22) DIXON, M., WEBB, E. C. (1979): *Enzymes.* 3rd edition, p. 92-93. Academic Press. New York.
- (23) GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M.; FERNÁNDEZ-TORROBA, M. A., PIZARRO, C. (1999): Study by response surface methodology of the swelling kinetic of weakly basic polyacrylamide gels in water. *Eur. Pol. J.* 35: 509-516.
- (24) DIMARZIO, E. A. (1964): Nature of the glass transition and the glassy state. *J. Res. Natl. Bur. Stds.* 68A: 611.
- (25) GLANS, J. H., TURNER, D. T. (1981): Glass transition elevation of polystyrene by crosslinks. *Polymer.* 22: 1540-1543.
- (26) SZABÓ, E. E.; ADÁNYI, N.; VÁRADI, M. (1996): Application of biosensor for monitoring galactose content. *Biosens. Bioelectron.* 11: 1051-1058.
- (27) TRÁČ, J.; NAVRÁTIL, M.; ŠTURDÍK, E., GEMEINER, P. (2001): Monitoring of dihydroxyacetone production during oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with an enzyme biosensor. *Enz. and Microb. Tech.* 28: 383-388.
- (28) TRESSEL, P. S., KOSMAN, D. J. (1982): Galactose oxidase from *Dactylium dendroides*. *Meth. Enzymol.* 89: 163-171.
- (29) RUBIO RETAMA, B. J.; LÓPEZ-RUIZ, B.; LÓPEZ-CABARCOS, E. J. (2005): High stability amperometric biosensor based on enzyme entrapment in microgels. *Talanta.* 68: 99-107.
- (30) HERVÁS PÉREZ, J. P.; SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ, M.; LÓPEZ-CABARCOS, E.; LÓPEZ-RUIZ, B. (2006): Amperometric tyrosinase biosensor based on polyacrylamide microgels. *Biosens. Bioelectron.* 22: 429-439.
- (31) COSNIER, S.; SZUNERITS, S.; MARKS, R. S.; NOVOA, A.; PUECH, L.; PÉREZ, E.; RICO-LATTES, I. (2001): A comparative physical study of two different hydrophilic synthetic latex matrices for the construction of a glucose biosensor. *Talanta.* 55: 889-897.

————— *Artículo original* —————

Spectrophotometric characterisation of the Cu(II):PPi system: implementation as a method for measuring pyrophosphate (PPi) in solution

Recibido el 15 de julio de 2006

M. FE DE LA TORRE¹, VANESA FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ¹,
ÁNGEL REGLERO¹ and IGNACIO G. BRAVO²

¹*Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de León.
Campus de Vegazana. 24071. León. Spain.*

²*Deutsches Krebsforschungszentrum. Im Neuenheimer Feld 242.
69120 Heidelberg. Germany.*

ABSTRACT

The interaction of Cu(II) with pyrophosphate (PPi) in solution modifies the absorption spectrum of the cation. We provide here a proper description of the chemical interactions involved in the absorbance shift, identify the absorption coefficients of the species in solution and afford a model of the Cu(II)-PPi chemical system. Since the changes in the absorption spectrum are concentration dependent, we describe a new method for quantifying PPi in aqueous solutions, based on the modification of the Cu(II) absorption spectrum in the presence of PPi. Changes in absorptivity can be monitored and used to quantify PPi in solution. The determination is simple, fast and cheap. The detection limit of the method is 0.1 μmol of PPi in the assay conditions. The presence of orthophosphate does not interfere in the determination of PPi. Furthermore, it is possible to use this method in biological systems containing proteins, nucleotides, EDTA or magnesium.

Keywords: Absorption spectra.—Bioinorganic chemistry.—Spectroscopy.—Pyrophosphate.—Copper.

Corresponding author: Prof. Dr. Ángel Reglero. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de León. Campus de Vegazana. 24071. León. Spain. Phone: +34 987 29 12 25. Fax: +34 987 29 12 26. e-mail: dbbarc@unileon.es

RESUMEN

Caracterización espectrofotométrica del sistema Cu(II):PPi, su implementación como un método para la valoración de pirofosfato (PPi) en solución

El pirofosfato (PPi) tiene una importante función en numerosos procesos biológicos. Participa en muchas reacciones enzimáticas catalizadas por transferasas, hidrolasas, ligasas o sintetasas.

La interacción en solución del Cu(II) con pirofosfato (PPi) modifica el espectro de absorción del catión. Se describen las interacciones químicas involucradas en el cambio de absorbancia, se identifican los coeficientes de absorción de las diferentes especies en solución y proponemos un modelo del sistema químico Cu(II)-PPi. Ya que los cambios en el espectro de absorción son dependientes de la concentración, nosotros proponemos un método para cuantificar PPi en soluciones acuosas basado en la modificación del espectro de absorción de Cu(II) en presencia PPi. Los cambios en la absorción pueden ser monitorizados y utilizados para cuantificar PPi en solución. La determinación es simple, rápida y barata. El límite de detección del método es 0,1 μmol de PPi en las condiciones del ensayo. Además es posible usar este método en sistema biológicos que contienen proteínas, nucleótidos, EDTA o magnesio.

Palabras clave: Espectro de absorción.—Química bioinorgánica.—Espectroscopía.—Pirofosfato.—Cobre.

INTRODUCTION

Pyrophosphate (PPi) plays an important role in many biological processes. It participates in many enzymatic reactions catalysed by transferases, hydrolases, ligases or synthetases. Phosphoric ester bound is highly energetic, and most of the reactions that require PPi make use of it for driving biochemical pathways on the appropriate direction. PPi is involved for instance in:

- i) the biosynthesis of nucleic acids: the enzymes DNA polymerase (EC 2.7.7.7) and RNA polymerase (EC 2.7.7.6) catalyse the transfer of a nucleotide monophosphate to a polynucleotide chain, with the release of PPi;
- ii) the biosynthesis of carbohydrates: cytidyltransferases transfer CMP from CTP to activate certain acceptors such as 3-deoxyoctulosonate (EC 2.7.7.38), N-acylneuraminate (EC 2.7.7.43) (1) or choline (EC 2.7.7.15), (2) releasing PPi;

- iii) the biosynthesis of proteins: certain transferases such as glutamine synthetase adenylyltransferase (EC 2.7.7.42), which participates in the regulation of glutamine synthetase (EC 6.3.1.2), transfer one monophosphate nucleotide from a triphosphate nucleotide, with the release of PPi; the enzymes called aminoacyl-tRNA synthetases catalyse the binding of each aminoacid with the corresponding tRNA, with the concomitant release of PPi from ATP;
- iv) the recovery of nitrogenous bases: hypoxanthine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.8) catalyses the transfer of a residue of ribose-5-phosphate from phosphoribosyl-PPi to a purine such as hypoxanthine or guanine, releasing a nucleotide and PPi; other enzymes of this group work in the same way to recover other bases.

In all the examples cited, further hydrolysis of PPi by pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) drives the equilibria in these reactions towards the corresponding anabolic sense.

The quantification of PPi is important not only to assess its presence and concentration in a sample, but also to determine enzymatic activities. Thus, the measurement of PPi released by a DNA polymerase can be used to quantify viral charge (3) or to determine the presence of PPi in animal (4) or plant (5) tissues. PPi is usually excreted in urine, and the PPi concentration is usually monitored as an indicator of renal function (6). Accordingly, the measurement of increased of PPi excretion in urine is the basis for confirmation of the diagnosis of the rare inherited disorder hypophosphatasia (7). Furthermore, in the industry PPi is often used as a additive in dentifrices, making it necessary to develop processes able to assess its concentration (8).

Several methods have been developed for the determination of PPi. The classical chemical method quantifies total phosphates by the generation of ammonium phosphomolybdate (9). Other approaches resolve the components of a sample by chromatography (10) or capillary electrophoresis (11) and quantify the corresponding compounds. Finally, the PPi-mediated quenching of fura-2 fluorescence can also be used to determining phosphate polymers of different lengths (12). In the biochemistry laboratory, PPi is

commonly determined by following the progress of enzymatic activities, coupling the hydrolysis of PPI either to the oxidation of NADH (13), to the emission of light by a luciferase (14) or to the formation of certain purines (15).

The PPI anion forms complexes with metallic cations, mainly divalent ones. This process is rapid and thermodynamically favoured. Accordingly, PPI is often used for the extraction and quantification of cations in soils (16), and for stabilizing Cu in plating and the manufacture of printed circuits (17). Likewise, PPI interference in the colorimetric determination of orthophosphate can usually be avoided by forming complexes with Cu or nickel (18).

We have extensively characterised the spectrophotometric changes in the Cu(II):PPI system, and modelled the absorption shift as a function of the interactions of the involved chemical species. On this basis, we report a new method for the determination of PPI, based on the modification of the Cu(II) absorption spectrum in the presence of PPI due to the formation of complexes between these two species. The method avoids most of the drawbacks usually encountered in the usual ways of PPI determination; it is simple, rapid and inexpensive, and allows the evaluation of enzymatic activities with a sensitivity limit of 0.1 μmol of PPI in the assay conditions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and chemicals

All solutions were prepared with deionized water.

Copper sulphate pentahydrate, sodium hydroxide, hydrochloric acid, trichloro acetic acid and glycine were purchased from PANREAC (Barcelona, Spain).

Sodium dodecyl sulphate (SDS) was purchased from BIORAD (Munich, Germany).

Sodium pyrophosphate decahydrate (3-[1,1-dimethyl-(2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid), sodium salt

(AMPSO), N,N-bis(2-hydroxyethyl) glycine (BICINE), 2-[N-cyclohexylamino]ethane, sulfonic acid (CHES), albumin from bovine serum (BSA), 4-morpholinepropanesulfonic acid, sodium salt (MOPS), sodium tetraborate, ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), adenosine 5'-triphosphate, disodium salt hydrate (ATP) and DOWEX® 50WX2-200 ion-exchange resin were purchased from SIGMA-ALDRICH (Sant Louis, USA). Before use, the resin was washed sequentially with 2 N sodium hydroxide, 2 N hydrochloric acid and water, and then allowed to dry overnight.

Tris-(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) and sodium hydrogenophosphate were purchased from PROLABO (Asturias, Spain).

Magnesium chloride hexahydrate was purchased from PROBUS (Barcelona, Spain).

Instruments

A Beckman DU-640 spectrophotometer with cuvettes thermostated at 37 °C was used to measure absorbance at 280 nm (A_{280}). Beckman quartz microcuvettes with 10 mm pathlength, 700 µl capacity and a 300 µl minimum volume for reading were used.

Procedure

Blank: 50 µL 10 mM CuSO_4 , 100 µl 0.5 M AMPSO, 100 µl 20% SDS, 200 µl 50 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ and 550 µl H_2O . Final concentrations were: $[\text{Cu}]_{\text{tot}} = 0.5 \text{ mM}$ and $[\text{PPi}]_{\text{tot}} = 10 \text{ mM}$. Sample: 50 µl 10 mM CuSO_4 , 100 µl 0.5 M AMPSO, 100 µL 20% SDS, 500 µl of a solution containing PPi and 250 µl H_2O . The value of A_{280} for the sample can be used directly for reading the concentration of PPi in the calibration curve (Fig. 7) or for calculating it by means of the corresponding expression (equation 1). If the concentration of protein in the sample was higher than 1 mg/mL, the protein was eliminated by precipitation with trichloroacetic acid before the addition of CuSO_4 . If the concentration of Mg(II) in the sample was higher than 1 mM, it was removed by the addition of DOWEX-50 at

the pH of the assay (AMPSO, NaOH, pH 9.4), centrifugation and recovery of the supernatant, which was treated as described above.

This study has been carried out using two blanks: one with Cu:PPi at a ratio of 1:20 and other with Cu:PPi at 1:5. The choice of one or the other depended on the expected amount of PPi in the problem solution. Here we report the calculations for the first blank.

Software

Curve fitting by non-linear simple and multiple regression analyses were accomplished with the QNFIT module from the SIMFIT, program developed by Prof. W. Bardsley and distributed freely by the author at <http://www.simfit.man.ac.uk>.

Statistical treatment

Each experimental condition was performed at least twice, and all experiments were replicated at least three times independently. Suspected outliers placed at 1.5 times the interquartile range above the third quartile or below the first quartile were considered carefully before being included in the analysis. Differences were considered significant applying the Kolmogorov-Smirnoff test, and further validated with Student's unpaired t-test when the experimental data were consistent with a normal distribution.

RESULTS

1. PPi forms complexes with Cu(II) in solution, thereby modifying its absorption spectrum.

In aqueous solution, the presence of PPi modified the absorption spectrum of Cu(II) in a concentration-dependent manner. Changes in absorptivity were monitored in the interval between 240 and 330 nm, keeping the concentration of Cu(II) constant while varying the PPi concentration.

Both PPI and Pi interact with Cu(II) in solution and modify its absorption spectrum in a concentration-dependent fashion (Fig. 1). The presence of both Pi and PPI increase the absorbance of Cu(II) in solution with a maximum at *ca* 250 nm. The presence of PPI decreases the absorbance of Cu(II) with a minimum at *ca* 290 nm. The wavelength of 280 nm was chosen for the assay in order to avoid interferences due to the presence of organic molecules, mainly aromatic rings and nitrogenous bases. The aim of this was to minimize the matrix effects in the sample when comparing one measurement with a calibration curve prepared with standards.

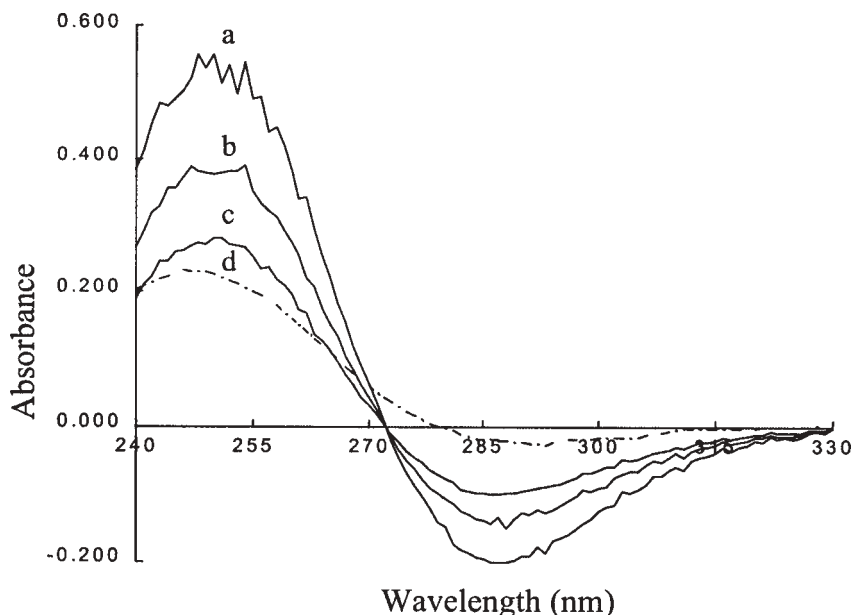
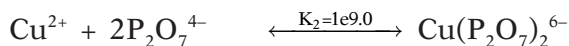
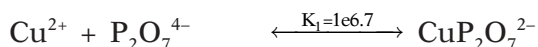


FIGURE 1. **Influence of pyrophosphate and orthophosphate on the absorption spectrum of Cu(II).** All determinations were carried out at pH 9.4 and 37° C. The blank was a solution 0.5 mM of CuSO_4 in water. The continuous lines correspond to the spectra of 0.5 mM CuSO_4 with 1, 0.5 and 0.1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, respectively for **a**, **b** and **c**. The broken line **d** corresponds to the spectrum of 0.5 mM CuSO_4 with 10 mM Na_3PO_4 . Formation of the Cu(II)-PPI complex decreased the absorption of Cu(II): it was minimum at 290 nm. Formation of the Cu(II)-PPI and Cu(II)-P_i complexes increased the absorption of Cu(II): its maximum was seen at 250 nm.

The presence of PPI decreases the absorptivity of Cu(II) in solution at 280 nm. Since monitoring an absorbance increase is more sensitive than monitoring a decrease, we chose a blank containing a high concentration of PPI and followed the increase in absorbance in the samples, which contain a lesser amount of PPI. Two blanks with different PPI concentrations were chosen, thus making the method suitable for use at different concentrations ranges of PPI: the first one with a cation: ligand ratio of 1:20 (0.5 mM CuSO₄, 10 mM Na₄P₂O₇) and the second one with a ratio of 1:5 (0.5 mM CuSO₄, 2.5 mM Na₄P₂O₇). Absorbance was maximum in the absence of PPI, decreased when the concentration of PPI in the sample increased, and was zero when [PPI] was 10 mM or 2.5 mM respectively.

Cu(II) and PPI form complexes in solution, rendering the species CuP₂O₇²⁻ and Cu(P₂O₇)₂⁶⁻. The corresponding equilibria are:



Cu(II) and PPI are also involved in different side reactions, which must also be considered. Thus Cu(II) participates in reactions of hydroxycplexes formation and PPI in protonation reactions, which are considered to be parasites of the main reactions. To deal with such parasite reactions, the constants that describe the main equilibria are redefined taking into account the simultaneous involvement of the chemical species in the different equilibria. For the Cu(II)/ PPI system the conditional constants are:

$$k_1' = \frac{[\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}]}{[\text{Cu}^{2+}]' [\text{P}_2\text{O}_7^{4-}]'} \quad k_2' = \frac{[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}]}{[\text{Cu}^{2+}]' [\text{P}_2\text{O}_7^{4-}]'^2}$$

where [Cu²⁺]' represents the concentration of Cu(II) in all the forms in solution, except the complexes with PPI, and [P₂O₇⁴⁻]' represents the concentration of PPI in all species except the complexes with Cu(II). The relationship between the conditional constants and the equilibrium constants is given by the coefficient of parasite reactions, defined as:

$$\alpha_{\text{Cu}^{2+}} = \frac{[\text{Cu}^{2+}]}{[\text{Cu}^{2+}]}$$

$$\alpha_{\text{P}_2\text{O}_7^{4-}} = \frac{[\text{P}_2\text{O}_7^{4-}]}{[\text{P}_2\text{O}_7^{4-}]}$$

$$\text{Therefore: } k_1' = \frac{K_1}{\alpha_{\text{Cu}^{2+}} \alpha_{\text{P}_2\text{O}_7^{4-}}} \quad k_2' = \frac{K_2}{\alpha_{\text{Cu}^{2+}} \alpha_{\text{P}_2\text{O}_7^{4-}}^2}$$

The equilibrium constants that describe the parasite reactions of Cu(II) with OH^- and of PPI with H^+ in solution are well documented in the literature. The value of $\alpha_{\text{Cu(II)}}$, α_{PPI} , k_1' and k_2' can therefore be expressed as a function of the experimental pH by means of the equilibrium constants. The dependence of these variables on pH is depicted in Fig. 2. Due to the presence of the parasite reactions, the conditional constants k_1' and k_2' for the system Cu(II)/PPI never reach the theoretical values for K_1 and K_2 , $1\text{e}6.9$ and $1\text{e}9.0$ respectively (Fig. 2).

2. The absorptivity shift of Cu(II) in the presence of PPI is maximum at pH 9.0

The conditional constants of the Cu(II)/ PPI system have maximum values in the pH range between 7 and 10 (see Fig. 2). In the determination of Cu(II) by dipyrrophosphatecuprate(II) titration, the pH used is also in that interval (19). In light of this, the effects of pH and of the nature of the buffer solution on the change in the absorbance due to PPI were checked in that pH interval. The results are shown in Fig. 3. A strong dependence of the shift in absorbance on both the pH and the nature of the buffer was observed. These variations might arise as a consequence of further interactions between Cu(II) and side groups of the buffer molecule.

For a Cu(II):PPI ratio of 1:20 and a buffer concentration in the sample of 50 mM, the largest change in A_{280} was observed for AMPSO/NaOH at pH 9.4 (Fig. 3). These conditions were therefore chosen for further experiments. The value of pH 9.4 corresponds to the pK_a of the AMPSO buffer and the pK_{a4} of pyrophosphoric acid. The values for the parasite reaction coefficients and for the conditional constants for the system at pH 9.4 are: $\alpha_{\text{Cu(II)}} = 4.06\text{e}3$, $\alpha_{\text{PPI}} = 2.00$, $k_1' = 6.15\text{e}4$ and $k_2' = 6.17\text{e}2$ (Fig. 2). The value 2.0 for

α_{PPI} means that half of the PPI molecules not forming complexes with Cu(II) appear as PPI anion, and nearly all the rest as hydrogenpyrophosphate anion. Regarding the Cu not forming complexes with PPI, only 0.025% appears as free cation, while 98% is in the form of dihydroxicuprate.

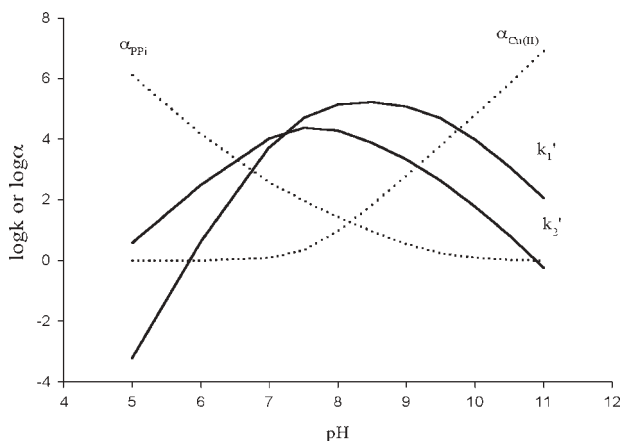


FIGURE 2. *Dependence of the values of $\alpha_{\text{Cu(II)}}$, α_{PPI} , k_1' and k_2' on the pH of the Cu(II)/PPI system. The maximum values of k_1' and k_2' never reach the theoretical values of K_1 and K_2 , respectively due to the parasite reactions of Cu(II) and PPI.*

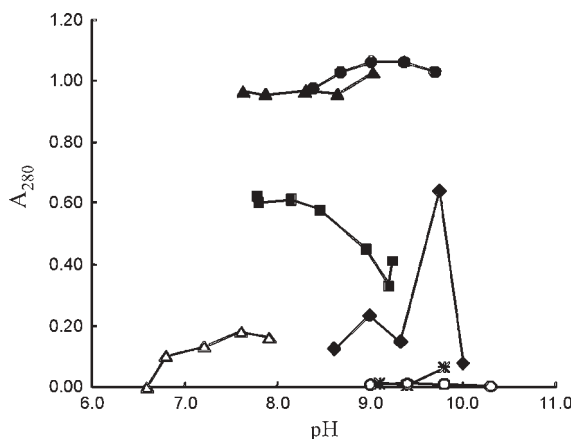


FIGURE 3. *Dependence of the A_{280} of Cu(II) on the pH and the buffer at 37°C. In all cases, the blank was a solution of 0.5 mM CuSO_4 and 10 mM $\text{Na}_3\text{P}_2\text{O}_7$. All buffers were tested at a concentration of 50 mM and adjusted to the final pH with HCl or NaOH. The different signs correspond to: ●, AMPSO, ▲, BICINE, ■, Tris, ◆, CHES, △, MOPS, *, borate and ○, glycine.*

Given the values of the conditional constants, a diagram of species for the system at pH 9.4 for $[\text{Cu(II)}]_{\text{tot}} = 0.5 \text{ mM}$ as a function of $[\text{PPi}]_{\text{tot}}$ can be built (Fig. 4). It can be observed that for values of $[\text{PPi}]_{\text{tot}}$ lower than 0.50 mM the introduction of PPi into the system leads to a linear increase in both $[\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}]$ and $[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}]$. In this range the slope of the straight line representing the variation of the species with two ligands is twice the slope of that representing the variation of the species with one ligand. $\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}$ predominates for $[\text{PPi}]_{\text{tot}}$ values lower than 10.7 mM, and the species with two ligands $\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}$ predominates when $[\text{PPi}]_{\text{tot}}$ increases.

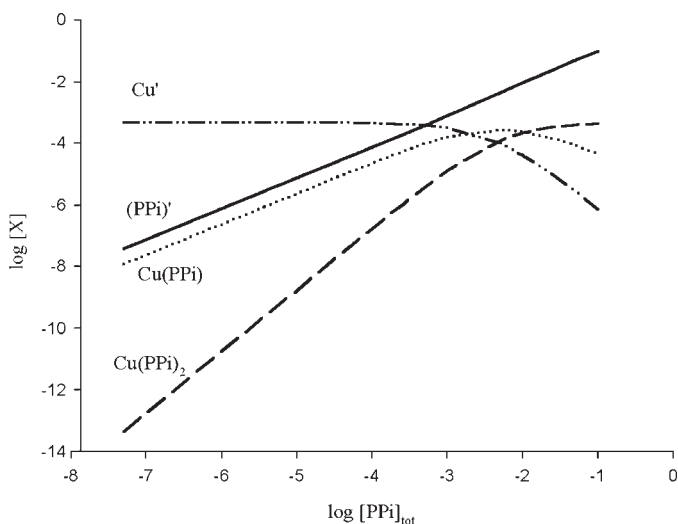


FIGURE 4. **Diagram of species for the Cu(II)/PPi, system added as CuSO_4 and $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ respectively.** Calculations were made for $[\text{Cu(II)}]_{\text{tot}} = 5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$, pH 9.4, considering the formation of the $\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}$ and $\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}$ complexes, with constants of formation $\log k_1' = 2.79$ and $\log k_2' = 4.79$ respectively.

3. Complexes of Cu(II) and PPi have a lower molar absorptivity than Cu(II) in solution.

In a multi-component system such as the one studied Cu(II)/PPi the Beer-Lambert law is additively applied to all the absorbent species. Thus, assuming that there is no interaction between the different components:

$$A_{280, \text{tot}} = A_{280, \text{Cu}'} + A_{280, \text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}} + A_{280, \text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}}$$

$$A_{280, \text{Cu}'} = \varepsilon_{\text{Cu}'} [\text{Cu}'] l$$

$$A_{280, \text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}} = \varepsilon_{\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}} [\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}] l$$

$$A_{280, \text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}} = \varepsilon_{\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}} [\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}] l$$

where $\varepsilon_{\text{Cu}'}$ represents the molar absorbance of all the species of Cu(II) in solution except for the complexes with PPI. According to the values obtained previously, it is assumed that virtually all the Cu not complexed with PPI appears as dihydroxicuprate, thus allowing us to consider a unique molar absorbance for all these species.

To determine the molar absorbance of the species in solution, four experimental data series were generated with increasing concentrations of Cu(II) in the 0.01 to 0.3 mM range: one series in the absence of PPI, and three with constant $[\text{Cu}]_{\text{tot}}:[\text{PPI}]_{\text{tot}}$ ratios of 2:1, 1:1 and 1:10, respectively. For each series A_{280} was measured. The results are depicted in Fig. 5.

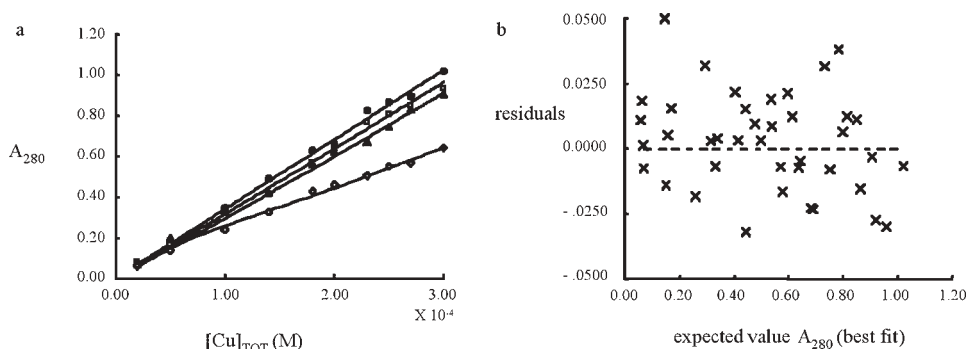


FIGURE 5. **Spectrophotometric characterisation of the CuII/PPI system.** (a) Plot of A_{280} against $[\text{Cu(II)}]_{\text{tot}}$ in 50 mM AMPSO/NaOH pH 9.4 and 37° C. The four data series correspond to: ●, absence of PPI; □, Cu(II):PPI 2:1; ▲, Cu(II):PPI 1:1; ◇, Cu(II):PPI 1:10. The fittings correspond to the best model with $\varepsilon_{\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}} = \varepsilon_{\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}} = 1373.8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \pm 107.3$, $\varepsilon_{\text{Cu}'} = 3372.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \pm 43.9$, expressed as value \pm gap of 95% confidence. (b) Plot of residuals against the expected value of A_{280} for the best fit considered. The distribution of the residuals is random and there is no bias in the distribution of the positive and negative strings ($P > 0.05$).

Even though the $[\text{Cu}]_{\text{tot}}:[\text{PPI}]_{\text{tot}}$ ratios were kept constant in the experimental design, the ratios $[\text{Cu}]:[\text{PPI}]:[\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}]:[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}]$ were not constant, as a further manifestation of the complexity of the system. In order to determine values of the molar absorptivities for each of the components of the system it was necessary to previously estimate the individual concentrations as a function of $[\text{Cu}]_{\text{tot}}$. Since there is no simple expression representing this dependence, the values were calculated analytically for each data, by using sequentially the expressions shown in Table 1.

TABLE 1. Expressions used for the analytical calculation of the concentration of each component of the system as a function of $[\text{Cu}]_{\text{tot}}$ and $[\text{PPI}]_{\text{tot}}$

Fixed	Used	Obtained
$[\text{Cu}]_{\text{tot}}$ and $[\text{PPI}]_{\text{tot}}$	$\frac{[\text{Cu}]_{\text{tot}}}{1 + k_1' [\text{PPI}]' + k_2' [\text{PPI}]'^2} = \frac{[\text{PPI}]_{\text{tot}} - [\text{PPI}]'}{k_1' [\text{PPI}]' + 2 k_2' [\text{PPI}]'^2}$	$[\text{PPI}]'$
$[\text{Cu}]_{\text{tot}}$, $[\text{PPI}]_{\text{tot}}$ and $[\text{PPI}]'$	$[\text{Cu}]' = \frac{[\text{PPI}]_{\text{tot}} - [\text{PPI}]'}{k_1' [\text{PPI}]' + 2 k_2' [\text{PPI}]'^2}$	$[\text{Cu}]'$
$[\text{Cu}]'$ and $[\text{PPI}]'$	$k_1' = \frac{[\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}]}{[\text{PPI}]' [\text{Cu}]'}$	$[\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}]$
$[\text{Cu}]'$ and $[\text{PPI}]'$	$k_2' = \frac{[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}]}{[\text{PPI}]'^2 [\text{Cu}]'}$	$[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}]$

The data were fitted empirically to polynomial or rational expressions of the lowest order necessary to provide acceptable fits and with comparable goodness. The expressions used are given in Table 2.

The empirical expressions were applied to four different models of the behaviour of the absorption of the system. Each one was fitted by non-linear multiple regression to the experimental data of the four series using the QNFIT module of the SIMFIT program. The four models assayed and the results of the respective fittings are given in Table 3. In all cases, the molar absorptivity of the Cu(II) species not complexed with PPI was assumed to be the same. Underlying this

assumption is the fact described above, with nearly all the Cu(II) not complexed with PPI being in the form of dihydroxycuprate. In the first model, the molar absorptivity of the Cu-PPI complexes is negligible, and absorbance is due exclusively to dihydroxycuprate. In the second model, the molar absorptivity of $\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}$ is negligible, and $\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}$ and dihydroxycuprate have the same molar absorptivity. In the third model, the molar absorptivity of $[\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}]$ and $[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}]$ is the same, and different from that of dihydroxycuprate. Finally, in the fourth model the molar absorptivities of $[\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}]$, $[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}]$ and dihydroxycuprate are different. The chemical description of these models is given in Table 3.

TABLE 2. Empirical expressions representing the dependence of $[\text{Cu}]'$, $[\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}]$ and $[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}]$ on $[\text{Cu}]_{\text{tot}}$ for the $\text{Cu}^{2+}/\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ system at pH 9.4 for different ratios of cation: ligand, $[\text{Cu}]_{\text{tot}}:[\text{PPI}]_{\text{tot}}$, and with $[\text{Cu}]_{\text{tot}}$ in the 0 to 0.30 mM range.

Cu(II): PPI 2:1	$[\text{Cu}]' = 0.9212 [\text{Cu}]_{\text{tot}}$ $[\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}] = 1.660e - 3[\text{Cu}]_{\text{tot}} + 285.0[\text{Cu}]_{\text{tot}}^2 + 1.580e5[\text{Cu}]_{\text{tot}}^3$ $[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}] = -1.167e - 4 [\text{Cu}]_{\text{tot}} + 1.665[\text{Cu}]_{\text{tot}}^2 - 5.986e3[\text{Cu}]_{\text{tot}}^3$
Cu(II): PPI 1:1	$[\text{Cu}]' = 0.8505 [\text{Cu}]_{\text{tot}}$ $[\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}] = 4.908e - 3[\text{Cu}]_{\text{tot}} + 546.2[\text{Cu}]_{\text{tot}}^2 - 3.579e5[\text{Cu}]_{\text{tot}}^3$ $[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}] = -4.476e - 4 [\text{Cu}]_{\text{tot}} + 6.915[\text{Cu}]_{\text{tot}}^2 + 2.080e4[\text{Cu}]_{\text{tot}}^3$
Cu(II): PPI 1:10	$[\text{Cu}]' = \frac{1.361e - 4 [\text{Cu}]_{\text{tot}}}{1.248e - 4 + [\text{Cu}]_{\text{tot}}}$ $[\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}] = 0.4311e[\text{Cu}]_{\text{tot}} + 479.0[\text{Cu}]_{\text{tot}}^2$ $[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}] = -0.02649[\text{Cu}]_{\text{tot}} + 576.2[\text{Cu}]_{\text{tot}}^2$

The results of the changes in absorbance as a function of the PPI concentration, for the four experimental series with different ratios Cu(II):PPI were fitted to the four models described above by non-linear multiple regression, using the same boundary conditions and initial limits. The best fit corresponded to the third model, in which the molar absorbance of the two complexes of Cu(II) with PPI was the same, and different from that of Cu(II) in solution. These values are $\epsilon_{\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}} = \epsilon_{\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}} = 1373.8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \pm 107.3$ and

$\epsilon_{\text{Cu}'} = 3372.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \pm 43.9$ respectively, expressed with the 95% confidence interval. The corresponding fit is depicted in Fig. 5a, and the plot of the residuals against the expected value is displayed in Fig. 5b, showing a random dispersion and an unbiased distribution of strings ($P > 0.05$).

TABLE 3. Description of the four models considered for the absorptivity of the $\text{Cu}^{2+}/\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ system at pH 9.4 together with the results of the corresponding non-linear multiple regression fittings to the experimental data

Model	Number of parameters	Number of imprecise parameters	Sum of deviations*
$\epsilon_{\text{Cu}'} \neq 0$ $\epsilon_{\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2}^{6-} = \epsilon_{\text{CuP}_2\text{O}_7}^{2-} = 0$	1	–	0.302
$\epsilon_{\text{Cu}'} = \epsilon_{\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2}^{6-} \neq \epsilon_{\text{CuP}_2\text{O}_7}^{2-}$	2	1	0.235
$\epsilon_{\text{Cu}'} \neq \epsilon_{\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2}^{6-} = \epsilon_{\text{CuP}_2\text{O}_7}^{2-}$	2	–	0.0166
$\epsilon_{\text{Cu}'} \neq \epsilon_{\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2}^{6-} \neq \epsilon_{\text{CuP}_2\text{O}_7}^{2-}$	3	1	0.0139

*The sum of deviations gathers the residual sum of squares

4. The influence of PPI on the absorbance of Cu in solution can be described by a mathematical model

Changes in the absorptivity of Cu(II) in aqueous solution in the presence of PPI were monitored for concentrations of $[\text{PPI}]_{\text{tot}}$ ranging from 0.005 to 10 mM. The results are shown in Fig. 6. The experimental data and the estimated values using the molar absorbance coefficients calculated previously are represented. The correspondence between both series reflects both the goodness of the response of the method and that of the estimated values found for $\epsilon_{\text{Cu}'}$ and $\epsilon_{\text{CuP}_2\text{O}_7}^{2-} = \epsilon_{\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2}^{6-}$. The mathematical expression used to

calculate A_{280} is:

$$A_{280, \text{tot}} = \epsilon_{\text{Cu}^{2+}}([\text{Cu}]^{\text{sample}} - [\text{Cu}]^{\text{blank}}) + \epsilon_{\text{CuP}_2\text{O}_7}([\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}]^{\text{sample}} - [\text{CuP}_2\text{O}_7^{2-}]^{\text{blank}}) + [\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}]^{\text{sample}} - [\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}]^{\text{blank}}$$

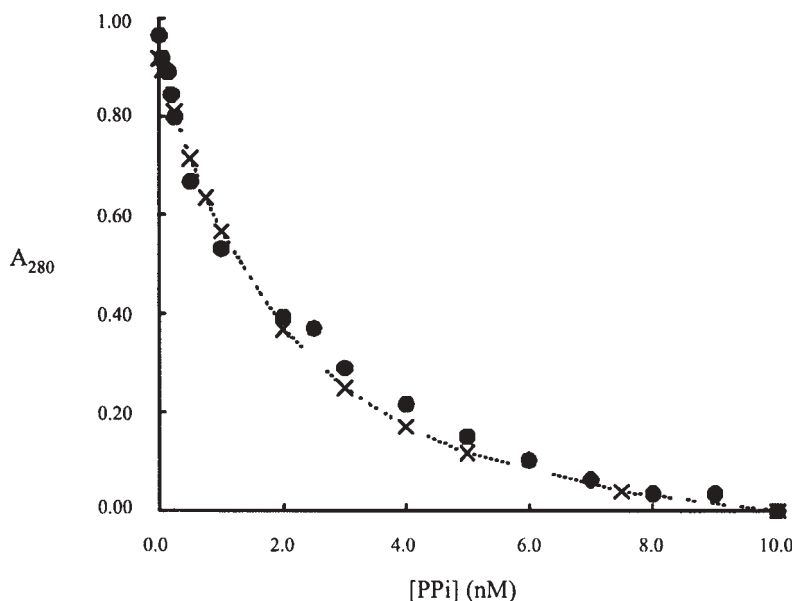


FIGURE 6. *Correspondence between expected and real behaviour for the Cu(II)/PPI system. Plotting of the experimental (●) and calculated (x, dotted line) values of A_{280} for the addition of PPI, with $[\text{Cu}]_{\text{tot}} = 0.50 \text{ mM}$, and containing the blank 0.50 mM CuSO_4 , $10.0 \text{ mM Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ in $100 \text{ mM AMP/SO/NaOH pH } 9.4$ at 37° C .*

where the values of the concentrations of the absorbent species are $[\text{Cu}]_{\text{blank}} = 4.14\text{e-}5$, $[\text{CuP}_2\text{O}_7]_{\text{blank}} = 2.38\text{e-}4$ and $[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2^{6-}]_{\text{blank}} = 2.21\text{e-}4$.

Owing to the impossibility of finding an easy mathematical expression affording A_{280} as a function of $[\text{PPI}]_{\text{tot}}$ we decided to describe the behaviour of the system by means of an empirical equation. The simplest expression providing the best fit with a minimum number of parameters was a modified hyperbolic decay:

$$A_{280} = p(1)[\text{PPI}]_{\text{tot}} + \frac{p(2) p(3)}{p(3) + [\text{PPI}]_{\text{tot}}}$$

where $p(1) = 1.269e-2 \pm 1.9e-3$, $p(2) = 0.9539 \pm 1.13e-2$, and $p(3) = 1.4866 \pm 9.29e-2$ expressed as data \pm standard error of the mean. The fitting of the experimental data to this expression and the 95% confidence limits are shown in Fig. 7. Other equations were also tested, and both hyperbolic decay and exponential decay rendered acceptable fits. However, according to the F criterion defined by Mannervik (20) the former equation provides the best fit, considering both the goodness of the fit and the number of parameters needed, and the current availability of non-linear fitting software does not justify the use of over-simplified mathematical approximations (21). On the other hand, we are aware that analytical methodology tends to prefer linear relationships. The inset in Fig. 7 shows the linear relationship between absorbance shift and [PPI] after an exponential decay fit ($r^2 = 0.9904$) for small [PPI] values.

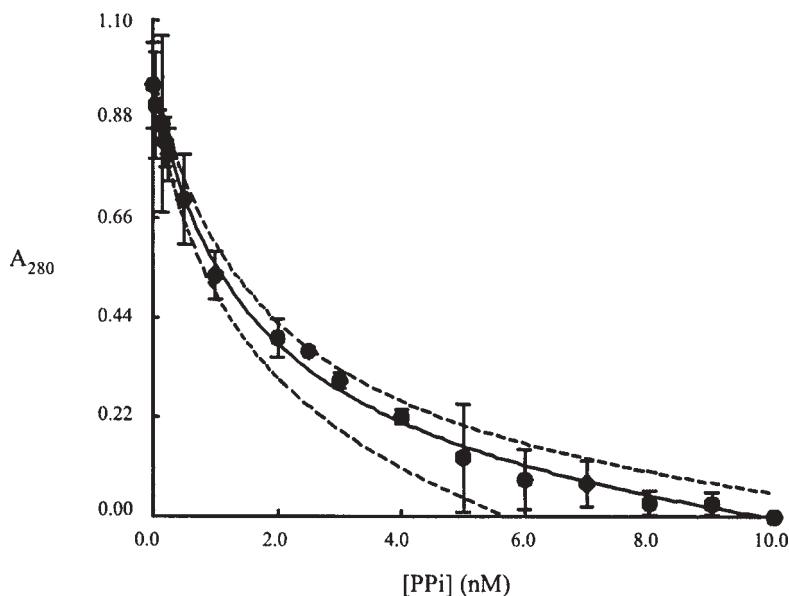


FIGURE 7. *Variation in the A_{280} of Cu(II) in the presence of PPI.* The blank contained 0.5 mM CuSO_4 , 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ in 100 mM AMPSO/NaOH, pH 9.4, at 37° C. The error bars encompass the gap of 95% confidence for each experimental value. The continuous line corresponds to the best fit for the empirical expression of A_{280} where $p(1) = -1.269e-2 \pm 1.9e-3$, $p(2) = 0.9539 \pm 1.13e-2$ and $p(3) = 1.4866 \pm 9.29e-2$ (values expressed as data \pm standard error of the mean). The broken lines delimit the gaps of 95% confidence for the best curve of fitting.

In our system, the signal at zero was 0.9539 ± 0.0632 , corresponding to a relative detection limit (3σ -criterion) of 0.233 mM, corresponding to 0.116 μmol of PPI. The sensitivity of the method is defined by the slope of the calibration line. In this case, between $[\text{PPI}] = 0.50$ and 2.0 mM there was a change of 0.30 absorbance units for each change of concentration unit (mM), corresponding to a change of 0.60 A_{280} units per mmol of PPI.

The sensitivity of the method proposed here can be compared with the sensitivity of enzymatic methods: it is thus higher than PPI spectrophotometric determination by NADH oxidation (13), similar to that of the formation of purines (15) and lower than that of the chemiluminescence quantification (14). A deeper comparison with other methods for measuring PPI is given below.

5. PPI can be determined spectrophotometrically in the presence of phosphate, SDS, Mg(II) and proteins

The interference of phosphate, SDS, proteins, EDTA, nucleotides and Mg(II) in the response of the analytic method proposed was investigated. Values are given as concentrations of interferent in the final mixture. For the estimation of the true interference values it must be noted that the sample represents half the volume of the final mixture (see Material and Methods).

Interference by orthophosphate

The interference produced by the presence of orthophosphate at final concentrations of 1, 10 and 50 mM was studied. No significant difference was found in the response of the method in the presence of orthophosphate, up to 50 mM ($P > 0.05$). The absence of interference produced by orthophosphate is the main difference between the method proposed here and methods that titrate total phosphates, monitoring either the formation of ammonium phosphomolybdate (9) or the formation of 2-amino-6-mercapto-7-methyl-purine (15). These chemical methods can not differentiate orthophosphate and PPI, and only those based on the enzymatic hydrolysis of PPI are able to discern between both species. The

spectrophotometric method reported here has sensitivity comparable to that of enzymatic methods but, in contrast, is inexpensive and less time-consuming. Furthermore, it avoids the competitive inhibition by orthophosphate in the enzymatic reactions coupled to the hydrolysis of PPI.

Interference by SDS

The interference produced by the presence of SDS in the medium was studied. Final concentrations of 0.50%, 1.0%, 5.0% and 10% w/v were assayed. No statistically significant differences were found ($P > 0.05$) up to 5% SDS upon comparison with the values observed without SDS (Fig. 8). The absence of interference by SDS allows working with a high number of samples without immediately processing them, and also permits measuring PPI in cell extracts.

Interference by proteins

Interference by protein at final concentrations of 0.1, 1.0 and 2.5 mg/mL was studied using bovine serum albumin. The presence of protein quenches the change in the A_{280} of Cu(II), possibly due to the reaction of the lone electron pair on the nitrogen of the peptide bond with Cu(II). For protein concentrations below 1 mg/mL, the behaviour of the system is restored in the presence of 1% SDS (Fig. 8). For concentrations of protein above 1 mg/mL, the addition of 1% SDS does not restore the behaviour of the system, although it does decrease the intensity of the interference. In these cases, protein can be removed to eliminate the interference by precipitation with trichloroacetic acid prior to the addition of CuSO_4 , as described under material and methods. This treatment does not affect the determination of PPI with CuSO_4 .

Interference by EDTA

Interference by EDTA at final concentrations of 0.1, 0.5 and 1 mM was studied. In all the cases, a decrease in the absorbance of

Cu(II) at 280 nm was observed, possibly due to the formation of complexes between this cation and the EDTA. The presence of 2% SDS restores the behaviour of the system for the concentrations tested (data not shown).

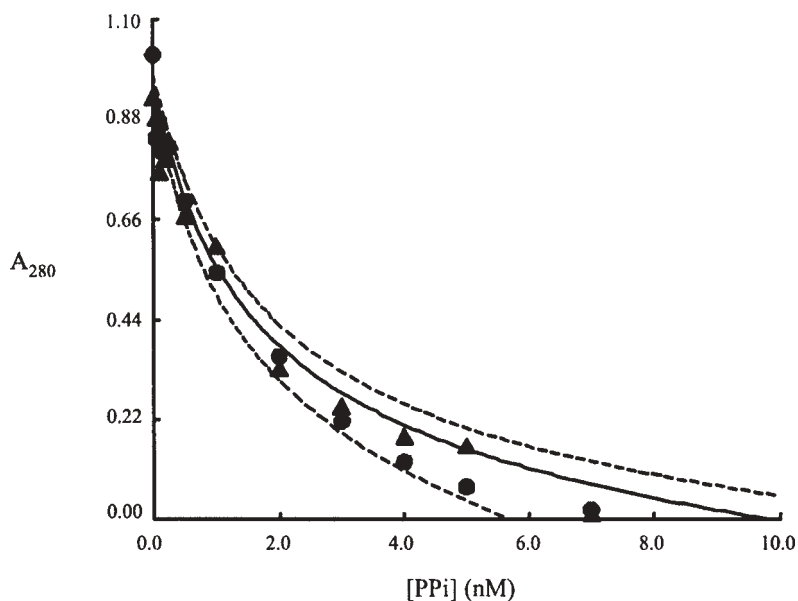


FIGURE 8. *Variation in the A_{280} of Cu(II) in the presence of PPI, and interferences produced by the presence of 5% SDS or 50 mM Na_3PO_4 . The blank contained 0.5 mM CuSO_4 and 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ in 100 mM AMP/NaOH, pH 9.4, at 37° C. The continuous line corresponds to the best fit in the absence of interferences. The broken lines delimit the margins of confidence for 95% of the curve. The presence of 5% SDS ● or 50 mM Na_3PO_4 ▲ did not significantly change the behaviour of the system ($P > 0.05$), which can be described by the same empirical equation.*

Interference by nucleotides

The influence of nucleotides in the medium at concentrations of 1.0 and 5.0 mM was studied using ATP. The presence of ATP decreases the absorbance of Cu(II), possibly by forming complexes with the polyphosphate tail. The addition of SDS 2% allowed this

interference to be controlled up to a concentration of 5 mM ATP (data not shown).

Interference by Mg(II)

The presence of Mg(II) is essential for the catalytic activity of many enzymes whose reaction product is PPI. Accordingly, interference by Mg(II) at concentrations of 1.0, 5.0 and 10.0 mM was studied. It resulted in a decrease in the absorbance of Cu(II) that was proportional to the concentration of MgCl₂ in the sample, probably due to the competition between Mg(II) and Cu(II) for PPI. The presence of 2% SDS allowed this interference to be overcome up to a concentration of 1 mM Mg(II) (data not shown). For higher concentrations of Mg(II), it was necessary to remove this cation from the reaction medium. This was accomplished by the addition of DOWEX-50 at the pH of the assay (AMPSO/NaOH pH 9.4), followed by centrifugation. The interference is thus abolished and the supernatant can then be treated as formerly described.

DISCUSSION

The interaction of PPI with Cu(II) in water solution modifies the absorption spectrum of the cation. We have spectrophotometrically characterised the Cu(II):PPI system and modelled the interaction between the different chemical species. We have provided here a proper description of the system, the equilibria, and the spectrophotometrical behaviour of the absorbent species. Since the changes in absorptivity are concentration-dependent, we have implemented the knowledge of the system into a spectrophotometric method for determining PPI in solution. The main advantages of the method for PPI determination here presented are its speed, simplicity, price, and relative high sensitivity. In comparison with methods based on chromatography (10) or capillary electrophoresis (11), titration with Cu(II) is more sensitive and the procedure is simpler, regarding both sample preparation and data reading.

Methods based on chemical reactions are less sensitive than the assay reported here. Another important difference with the method

based on the generation of ammonium phosphomolybdate (9), is its selectivity: Cu(II) titration allows measurement of 0.5 mM PPI in the presence of 50 mM orthophosphate.

The spectrophotometric method reported here is especially useful for quantifying PPI in the biochemistry laboratory. In this environment, enzymatic methods are the standard, but they fail to achieve direct detection of PPI; instead, they follow the progress of enzymatic activities such as the oxidation of NADH (13), the emission of light by a luciferase (14) or the formation of purines (15), all of them coupled to the hydrolysis of PPI. With the titration with Cu(II) it is possible to measure PPI directly, therefore decreasing the error in the measurements. Regarding sensitivity, the proposed method is more sensitive than following NADH oxidation, similar to the monitoring of purine synthesis, and less sensitive than quantification of light emission by luciferase. Before applying these enzymatic methods, moreover, the activities of many reagents must be monitored to ensure that PPI is in fact the rate-limiting component in the assay. Furthermore, the components of such assays often contain compounds that may hamper the proper development of enzyme activity. It is necessary therefore to spend time establishing the optimum assay conditions before using these methods (22). Additionally, enzymatic protocols are usually cumbersome, they waste reagents and are time-consuming. In comparison with this, the method here described is rapid and these complexes are stable at the assay temperature used.

Regarding the robustness of the assay, the use of SDS makes it possible to stop enzymatic reaction and collect a large number of samples or cell extracts with no need of immediately reading each of them. Interferences by proteins up to 1 mg/mL, EDTA up to 1 mM, ATP up to 5 mM and MgCl₂ up to 1 mM can be overcome by addition of SDS to the sample. Regarding the presence of nucleotides, enzymatic methods such as that based on the formation of purines permit the presence of ATP only up to 0.5 mM; others, such as that employing luciferase, cannot be used if ATP is a component of the sample. Simple modifications of the general procedure are also provided for cases with higher concentrations of proteins or MgCl₂ in the sample.

An enzymatic method for measuring PPI coupled to NADH oxidation is commercially available, but is expensive: each determination has an average cost of 10€ and needs *ca* 30 min *per* point to be completed. Compared with this, Cu(II) titration is inexpensive and the only additional reagent is inorganic, CuSO₄, thus allowing low assay costs.

CONCLUSIONS

Here we present a comprehensive chemical and spectrophotometric description of the Cu(II):PPI, implementable as spectrophotometric method for the quantification of PPI. This method is based on modification of the Cu(II) absorption spectrum in the presence of PPI by following the formation of complexes between these two species. The sensitivity limit of the method is 0.1 µmol of PPI, such that it is possible to titrate small amounts of this product and work with microsamples.

The determination is rapid. The formation of complexes between Cu(II) and PPI is immediate and these complexes are stable at the assay temperature, so it is possible to analyse many samples in a short period of time.

The procedure to quantify PPI is also simple and a general procedure is described including preparation of the blank and the sample at the assay pH. SDS is added to avoid interferences by proteins, nucleotides, EDTA and Mg(II). Modifications of the method in the presence of high concentrations of proteins and Mg(II) do not represent a significant change in this general procedure and are also properly detailed.

The determinations achieved with the proposed method are inexpensive. The only additional reagent is CuSO₄, and hence the assays can be considered to have virtually zero cost.

These characteristics make the Cu(II) titration appropriate for the determination of PPI in chemical and biochemical reactions. The method also allows the measurement of PPI in the presence of orthophosphate. Accordingly, it is possible to quantify mixes of these two analytes.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by MCYT BMC2003-02226.

REFERENCES

- (1) BRAVO, I. G.; BUSTO, F., DE ARRIAGA, D.; FERRERO, M. A.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L. B.; MARTÍNEZ-BLANCO, H. and REGLERO, A. (2001): Kinetic properties of the acylneuraminate cytiyltransferase from *Pasteurella haemolytica* A2. *Biochem. J.* 358: 585-598.
- (2) KENT, C. (1997): CTP-phosphocholine cytidyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1348: 79-90.
- (3) NYGREN, M.; RONAGHI, M.; NYREN, P.; ALBERT, J. and LUNDEBERG, J. (2001): Quantification of HIV-1 using multiple quantitative polymerase chain reaction standards and bioluminometric detection. *Anal Biochem.* 288: 28-38.
- (4) COOK, G. A.; O'BRIEN, W. E.; WOOD, H. G.; KING, M. T. and VEECH, R. L. (1978): A rapid enzymatic assay for the measurement of inorganic pyrophosphate in animal tissues. *Anal Biochem.* 91: 557-565.
- (5) TAKESHIGE, K. and TAZAWA, M. (1989): Determination of the inorganic pyrophosphate level and its subcellular localization in *Chara corallina*. *J. Biol. Chem.* 264: 3262-3266.
- (6) MARCH, J. G.; SIMONET, B. M. and GRASES, F. (2001): Determination of pyrophosphate in renal calculi and urine by means of an enzymatic method. *Clin. Chim. Acta.* 314: 187-194.
- (7) RUSELL, R. G. (1965): Excretion of inorganic pyrophosphate in hypophosphatasia. *Lancet.* 2. 461-464.
- (8) WHITE, D. J. and GERLACH, R. W. (2000): Anticalculus effects of a novel, dual-phase polypyrophosphate dentifrice: chemical basis, mechanism, and clinical response. *J. Contemp. Dent. Pract.* 15: 1-19.
- (9) SHATTON, J. B.; WARD, C.; WILLIAMS, A. and WEINHOUSE, S. (1983): A microcolorimetric assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal Biochem.* 130: 114-119.
- (10) YOZA, N.; AKAZAKI, I.; UEDA, N.; KODAMA, H. and TATEDA, A. (1991): High-performance liquid-chromatographic determination of pyrophosphate in the presence of a 20,000-fold excess of ortophosphate. *Anal Biochem.* 199: 279-285.
- (11) HENIN, O.; BARBIER, B. and BRACK, A. (1999): Determination of phosphate and pyrophosphate ions by capillary electrophoresis. *Anal Biochem.* 270: 181-184.
- (12) LORENZ, B.; MÜNKER, J.; OLIVEIRA, M. P.; LEITAO, J. M.; MÜLLER, W. E. and SCHRÖDER, H. C. (1997): A novel method for determination of inorganic polyphosphates using the fluorescent dye Fura-2. *Anal Biochem.* 246: 176.
- (13) O'BRIEN, W. E. (1976): A continuous spectrophotometric assay for arginosuccinate synthetase based of pyrophosphate formation. *Anal Biochem.* 76: 423-430.

- (14) ERIKSSON, J.; KARAMOHAMED, S. and NYREN, P. (2001): Method for renal-time detection of inorganic pyrophosphatase activity. *Anal Biochem.* 293: 67-70.
- (15) WEBB, M. R. (1992): A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4884-4887.
- (16) LOZANO CEREZO, M. L.; FERNÁNDEZ MARCOS, M. L. and ÁLVAREZ RODRÍGUEZ, E. (1999): Heavy metals in mine soils amended with sewage sludge. *Land Degradation Development.* 10: 555-560.
- (17) SNYDER, D. L. Copper plating. <http://www.pfonline.com/articles/pdf0014.html>.
- (18) TEWARI, K. K. and KRISHAN, P. S. (1960): The colorimetric determination of orthophosphate in the presence of condensed phosphates. *Anal. Chim. Acta.* 22: 111-117.
- (19) HAJ-HUSSEIN, A. T. (1996): Ultraviolet spectrophotometric determination of copper in copper ores by flow-injection analysis. *Talanta.* 43: 1909-1914.
- (20) MANNERVIK, B. (1982): Regression analysis, experimental error and statistical criteria in the design and analysis of experiments for discrimination between rival kinetic models. *Meth. Enzymol.* 87: 370-390.
- (21) BARDSLEY, W. G.; BUKHARI, N. A. J.; FERGUSON, M. W. J.; CACHAZA, J. A. and BURGUILLO, F. J. (1995): Evaluation of model discrimination, parameter estimation and goodness of fit in nonlinear regression problems by test statistics distributions. *Computers Chem.* 19: 75-84.
- (22) KRUGER, N. J. (1995): Errors and artifacts in coupled spectrophotometric assays of enzyme activity. *Phytochemistry.* 38: 1065-1071.

INFORMACIÓN ACADÉMICA

Sesiones Científicas

21 de septiembre

A las 19,00 horas, Conferencia por el Excmo. Sr. Don Bernabé Sanz Pérez, Académico de Número, titulada: «De los Andes a Europa. Historia y difusión de las patatas».

28 de septiembre

A las 19,00 horas, Toma de posesión como Académico Correspondiente Extranjero del Profesor Doctor George V. Hillyer, Catedrático de Pathology & Laboratory Medicine del Campus de Ciencias Médicas de la Universidad de Puerto Rico, quien pronunció su conferencia titulada: «Camino hacia una vacuna contra trematodos». La presentación corrió a cargo del Académico de Número, Excmo. Sr. Don Antonio R. Martínez Fernández.

5 de octubre

A las 19,00 horas, Mesa Redonda sobre: «Innovación farmacéutica. Cáncer». Ponentes: Excmo. Sr. Don Antonio Monge Vega, Académico de Número: «Los medicamentos de 2005. Reflexiones sobre la innovación en cáncer»; Excmo. Sr. Don José Prous, Presidente de Prous Sciences: «Integrity. Un nuevo instrumento para el descubrimiento de medicamentos», y Excma. Sra. Doña Rosario Perona, Presidente de ASEICA: «Cáncer. Las nuevas aproximaciones».

10 de octubre

Mesa Redonda de la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales sobre el «Balneario de Puenteviesgo». Ponentes: Profesora Doña Esperanza Torija Isasa: «Análisis físico-químico de las aguas del balneario»; Profesora Doña Milagros Pozuelo Cuervo: «Análisis de la radiactividad en las aguas del balneario», y Profesor Don An-

tonio Ramírez Ortega: «Análisis hidrogeológico de las aguas del balneario».

19 de octubre

A las 19 horas toma de posesión de su plaza de Académico Correspondiente la Ilma. Sra. Doña Juana Benedí González, quien pronunció su conferencia: «Mecanismos neuroprotectores de productos naturales». Le presentó en nombre de la Corporación el Académico Secretario Profesor Doctor Antonio Doadrio Villarejo.

26 de octubre

A las 19 horas tomó ingreso como Académico de Número el Excmo. Sr. Don Joan J. Guinovart, quien leyó su discurso titulado: «De la investigación básica al descubrimiento de fármacos». Fue contestado en nombre de la Corporación por la Excma. Sra. Doña María Teresa Miras Portugal.

2 de noviembre

Presentación de la Monografía de la RANF: «Influenza aviar y gripe humana de origen aviario» a cargo del Presidente de la RANF, Excmo. Sr. Don Juan Manuel Reol Tejada y del Coordinador de la obra, Excmo. Sr. Don Bernabé Sanz Pérez. Intervienen el Doctor Juan Ortí: «Biología molecular del virus» y el Excmo. Sr. Don Juan Tamargo Menéndez: «Tratamiento de la gripe».

7 de noviembre

Mesa Redonda de la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales sobre el «Balneario de Puenteviego». Ponentes: Doctor Francisco Javier Mantero Sáenz: «Climatología del Balneario de Puente

Viesgo». Profesor Raimundo Jiménez Ballesta: «Los suelos del término municipal de Puente Viesgo». Doctor Agustín Valero Castejón y Doctora Josefina San Martín Bacaicoa: «Acción terapéutica de las aguas mineromedicinales del Balneario de Puente Viesgo».

16 de noviembre

A las 19 horas tomó posesión de su plaza de Académico Correspondiente, el Profesor Doctor Don Francisco J. Sánchez Muniz, Catedrático de Nutrición de la Universidad Complutense, quien pronunció su conferencia titulada: «El aceite de oliva, clave de vida en la Cuenca Mediterránea». La presentación corrió a cargo del Académico de Número, Excmo. Sr. Don Bernabé Sanz Pérez.

Noticias

El día 9 de septiembre, en el XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM), a la Doctora María Teresa Miras Portugal, Académica de Número de la RANF, se le hizo entrega de la Medalla de Honor de dicha sociedad. En el mismo acto, la Doctora Miras Portugal impartió la Conferencia Plenaria Alberto Sols, titulada: «Funciones Extracelulares del ATP: Receptores y Señalización». En dicho acto el Presidente de la Sociedad, Doctor Don Vicente Rubio, le entregó la placa conmemorativa del acto y la medalla de Socio de Honor de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

* * *

El día 18 de septiembre falleció el Doctor Salvador Brossa Rabasa, Académico Correspondiente de esta Real Academia.

* * *

El día 21 de septiembre, el Profesor Don Antonio Monge, Académico de Número, dictó la conferencia inaugural del Curso Académico 2006/2007, de la Universidad de Navarra, titulada: «Investigación y medicamentos. Cooperación, reto y oportunidad para los países en desarrollo».

* * *

El Profesor Doctor Don Juan Ramón Lacadena, Académico de Número, fue nombrado el 26 de septiembre, Profesor Honorario de la Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú.

* * *

La sesión celebrada el día 28 de septiembre fue la primera en ser retransmitida en directo por Internet. En dicha sesión tomó pose-

sión de su plaza de Académico Correspondiente el Profesor George V. Hillyer.

* * *

El día 5 de octubre fue presentada en nuestra Sede la Base de Datos Farmacéutica Integrity de Prous Science.

* * *

El 7 de octubre tomaron posesión de sus plazas de Académicos Correspondientes extranjeros, los Doctores Charon Robin Ganellin y Per Lennart Lindberg. El acto tuvo lugar en la Novartis Foundation, dentro de la Sesión de la IUPAC Subcommittee of Medicinal Chemistry and Drug Development, celebrada en Londres.

* * *

Los días 9 y 10 de octubre, el Profesor D. Cabezas Fernández del Campo, impartió un ciclo de conferencias en el Instituto de España sobre la Gripe Aviar.

* * *

Del 23 al 26 de octubre, la Doctora Ana M.^a Pascual Leone, Académica de Número, coordinó un ciclo de conferencias en el Instituto de España sobre: «Procesos epigenéticos: postformación y factores externos».

* * *

Durante los días 26 y 27 del mes de octubre ha tenido lugar el VII Congreso de Ciencias Farmacéuticas y el XXVI Symposium de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, presidido por el Profesor Alberto Giráldez Dávila, Académico de Número, y como Vice-Presidente el Doctor Miquel Ylla-Catalá, Académico Correspondiente, con intervenciones destacadas de otros Académicos, como el

Profesor Joan Guinovart, el Profesor Fidel Ortega, el Profesor José Ángel Navarro, el Profesor José Martínez Lanao, el Profesor Agustín García Asuero, el Profesor Victoriano Darías y el Presidente de la RANF, Doctor Don Juan Manuel Reol Tejada.

* * *

El Académico Doctor Bartolomé Ribas Ozonas fue invitado a las Jornadas Científicas Franco-Armenias que se celebraron en París los días 13 al 18 de noviembre de 2006, bajo los auspicios de la Academia Internacional de Ciencias Ararat y el Alto Patronazgo de la Academia Nacional de Medicina de Francia. El día 15 de noviembre de 2006, el Doctor Ribas Ozonas intervino con el tema «Cancer et dysfonction de la chaîne de transport des électrons en Toxicologie» en el Anfiteatro de dicha Academia Nacional de Medicina de Francia.

* * *

El Doctor Bartolomé Ribas Ozonas fue invitado y participó en la Reunión y Sesión Necrológica para el Académico Correspondiente Ing. Dr. h. c. Marin R. Mehandjiev, de la «Balkan Academy of Sciences and Culture» de la que es Académico cofundador, con sede en Sofía, Bulgaria.

* * *

Los días 20 a 22 de noviembre, se celebró en nuestra Sede, el curso de la AEFI: «El papel del Clinical Trial Administrator en investigación clínica».

Noticias de la Biblioteca

En reconocimiento de gratitud se comunica que la Biblioteca de la Real Academia Nacional de Farmacia ha recibido las siguientes donaciones:

- A) Doctor Don Juan Manuel Reol Tejada, seis obras de especial interés que se incorporan a los fondos bibliográficos.
- B) Doctor Don Víctor Jiménez, dos obras originales, suyas, de reciente publicación.
- C) Doctor Don José Antonio Cabezas Fernández del Campo: 56 obras de consulta que se incorporan a los fondos bibliográficos.
- D) Doctor Don Juan Abelló Gallo: la obra facsímile: *Andreae Vesalii de humani corporis fabrica libri septem*, que se incorpora a los fondos.
- E) Doctor Don Miguel Fernández Braña: seis obras, entre ellas dos tesis doctorales y tres actas de Congreso de la American Chemical Society.
- F) Doctor Don Manuel Domínguez Carmona: dos obras de consulta sobre inmunología.

Asimismo se indica que en la Biblioteca se ha abierto un libro de registro de donaciones, inaugurado con las arriba indicadas. Se invita a todos los académicos a contribuir al enriquecimiento de la biblioteca, con la donación de obras de consulta y especial relieve.

NORMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

A. Política Editorial

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* es una revista trimestral que publica trabajos de investigación básica o aplicada relacionados con las ciencias farmacéuticas y afines.

2. Serán aceptados y considerados para publicación, aquellos manuscritos que no hayan sido publicados previamente (excepto resúmenes), que actualmente no estén siendo revisados en otras revistas, que su publicación haya sido aprobada por todos los autores y tácitamente o explícitamente por las autoridades responsables de los laboratorios donde se ha desarrollado el trabajo, y que si es aceptado, no será publicado en otra revista en la misma forma, en el mismo o diferente idioma, sin el consentimiento de los Editores.

3. El manuscrito original, una copia y la versión electrónica en CD, se enviará, con la correspondiente carta de presentación, a la siguiente dirección:

Doctora María Teresa Miras Portugal
 Editora de los ANALES DE LA REAL
 ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
 Real Academia Nacional de Farmacia
 C/ Farmacia, 11
 28004 Madrid
 España
 Fax: 91 531 03 06

Existe la posibilidad de enviar el manuscrito en formato electrónico como archivo adjunto a la siguiente dirección: edicion@ranf.com. Tanto el texto como las figuras deberán ser enviadas en archivos separados. Los formatos aceptados son: .doc (Word) para el texto, y formato TIFF, JPG o PPT (Power Point) para las figuras.

4. Tipos de Manuscritos.

La revista considerará para publicar lo siguiente:

— REVISIONES: no deben tener una extensión superior a las 4.000 pala-

bras (excluyendo resumen, bibliografía y página del título, pero incluyendo la leyenda de las figuras y las tablas) y la bibliografía no debe superar las 40 citas. Aunque la mayor parte de las revisiones serán invitaciones a petición de la Comisión Editorial, los autores interesados en contribuir con revisiones deben contactar previamente con el Editor.

- ARTÍCULOS ORIGINALES: no deben tener una extensión superior a 4.000 palabras (excluyendo resumen, bibliografía y página del título, pero incluyendo la leyenda de las figuras y las tablas) y la bibliografía no debe superar las 40 citas.
- COMUNICACIONES BREVES: artículos breves y definitivos. El manuscrito debe ser identificado como tal en la carta de presentación. La extensión no sobrepasará las 2.500 palabras incluyendo la bibliografía (no más de 10 citas) y con un máximo de tres figuras/tablas.
- CARTAS AL EDITOR: no deben superar las 1.000 palabras de extensión con un máximo de tres citas bibliográficas. Las cartas deben enfocarse en comentar artículos publicados previamente, o tratar diferentes aspectos de Política Educativa, Sanitaria y Ciencias Farmacéuticas.
- INFORMACIÓN ACADÉMICA: esta sección dará cuenta de las sesiones científicas, cursos, reseñas de libros, novedades editoriales y otros eventos que la revista considere de interés para los lectores.

B. Organización de los manuscritos

Todos los elementos o partes del manuscrito deben ir a doble espacio, todas las páginas numeradas en la esquina superior derecha empezando en la página de la portada. Los manuscritos referentes a artículos originales deberán

contener, en este orden, los siguientes apartados:

1. PORTADA

Título

Debe ir tanto en español como en inglés. Tendrá una extensión inferior a los 100 caracteres, excluyendo los espacios entre palabras.

Nombre de los autores

El nombre completo de todos los autores y su afiliación institucional. En los trabajos que tengan más de un autor y más de una Institución, indicar la afiliación individual mediante números en superíndices.

Palabras Clave

Cinco palabras clave (en español y en inglés) que no aparezcan en el título.

Información de contacto

Nombre, dirección postal, número de teléfono, fax y dirección de correo electrónico del autor al que se enviarán las galeradas.

Lista de Abreviaturas

Las abreviaturas y su significado deben incluirse en una lista en el mismo orden en el que se mencionan en el artículo.

2. PÁGINA DEL RESUMEN

Incluirá el resumen del artículo en español y en inglés. Deberá escribirse como texto continuo y se organizará del siguiente modo: una pequeña introducción donde se expliquen los antecedentes y los objetivos del trabajo, principales resultados y, finalmente, las conclusiones. Su extensión no debe superar las 250 palabras.

3. SECCIONES DEL MANUSCRITO

• INTRODUCCIÓN

Exponer información principal y antecedentes del tema que puedan orientar al lector.

• MATERIAL Y MÉTODOS (PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES)

En esta sección se explicarán los métodos experimentales empleados en el trabajo con un nivel de detalle suficiente que permita a otros investigadores repetir el trabajo; para aquellos métodos empleados sin modificaciones significativas respecto al método original, la citación del trabajo original será suficiente.

Experimentación en humanos

En aquellos trabajos de investigación que requieran de seres humanos, se deberá proporcionar: (a) consentimiento por escrito de cada paciente o sujeto sano; (b) el protocolo del estudio conforme con las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975, reflejado por la aprobación del comité apropiado de revisión de la institución. Se hará referencia a cada paciente mediante números, no mediante iniciales.

Experimentación animal

En los estudios en los que se emplee experimentación animal, se asegurará que todos los animales reciben cuidados humanos de acuerdo con los criterios resaltados en «Guía para el cuidado y empleo de animales de laboratorio», preparada por la National Academy of Sciences y publicada por National Institutes of Health (NIH publicación 86-23, revisada en 1985).

Fabricantes y proveedores

Incluir los nombres y las localidades (ciudad y estado o país) de los fabricantes y proveedores cuando se mencionen fármacos, instrumentación, aparatos, software, etc.

• RESULTADOS

Se presentarán los principales hallazgos del estudio en forma gráfica cuando sea posible. No ilustrar los pequeños detalles si su información puede ser descrita adecuadamente mediante texto.

• DISCUSIÓN

En esta sección se presentarán de forma concisa las implicaciones de los nuevos hallazgos en el campo que corresponda, minimizando la reiteración de los resultados, evitando la repetición de información dada en la introducción, y ajustándose al enfoque y objetivo inicial del trabajo.

• AGRADECIMIENTOS

Se incluirán los agradecimientos al personal de apoyo y a proveedores de reactivos especiales. Las becas y ayudas financieras se deberán incluir en esta sección.

• BIBLIOGRAFÍA

Las citas bibliográficas tienen que numerarse entre paréntesis en la línea de texto, por ejemplo (7), o (11-13, 17), en el orden de citación en el texto. La bibliografía se incluirá al final del artículo. Sólo se podrán citar como artículos «en prensa» a aquellos de los que se incluye una copia de la carta de aceptación en el envío inicial. Las citas deben incluir el título completo del artículo y citarse en el siguiente formato:

Ejemplos de revistas (1) (2) y libros (3) (4):

- (1) MACKINNON, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555: 62-65.
- (2) NIXON, J. E.; WANG, A.; MORRISON, H. G.; MCARTHUR, A. G.; SOGIN, M. L.; LOFTUS, B.J. y SAMUELSON, J. (2002) A splicesomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 422-431.
- (3) LANGER, T. y NEUPERT, W. (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. en: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., Eds.), pp. 53-83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- (4) FELDMANN, H. (2004) Forty years of FEBS. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

• TABLAS

Cada tabla debe ir preparada en hoja individual, a doble espacio y numeradas consecutivamente con números arábigos en el orden en el que aparecen en el texto. No duplicar material que ya haya sido presentado en una figura.

• LEYENDAS DE FIGURA

Las leyendas deben ir numeradas con números arábigos en el mismo orden en el que aparecen en el texto. El título de la leyenda de la figura no debe aparecer dentro de la propia figura, y debe proporcionarse suficiente información para que la figura sea inteligible sin hacer referencia al texto. Dentro de la leyenda deben ser explicados todas las abreviaturas y símbolos. Las leyendas de figura aparecerán todas de manera consecutiva en hoja aparte.

• FIGURAS

La revista solicita un juego completo de figuras. En el reverso de cada figura debe ir marcado en lápiz el número de cada figura, su orientación y el nombre del primer autor.

Blanco y negro

La revista alienta el envío de figuras en blanco y negro. Éstas deben ser impresiones láser de dibujos en blanco y negro y fotografías en brillo de alto contraste de todas las figuras de semitono, por ejemplo, microfotografías, geles, etc.

Color

Proporcionar impresiones en papel brillante donde los símbolos y texto se aprecien claramente frente al fondo de la figura. El Editor y el Comité Editorial seleccionarán las figuras en color que serán publicadas.

Las figuras en color deben tener un alto contraste, sin fondo coloreado y con la posibilidad de aparecer en blanco y negro en la versión impresa de la revista.

Como se indicó previamente, si el envío del manuscrito se realiza vía e-mail, no es necesario mandar el juego completo de figuras impreso en papel.

PERMISOS

Citaciones directas, tablas o ilustraciones tomadas de material protegido por copyright, deben ir acompañadas del permiso escrito del Editor y el autor original para poder ser utilizadas.

REVISIÓN Y PUBLICACIÓN

Todos los manuscritos enviados para publicación serán revisados por dos evaluadores del área de referencia del trabajo. El Editor elegirá los evaluadores más apropiados para cada manuscrito. El manuscrito que requiera más de una revisión o que en el plazo superior a dos meses no sea remitido a la revista desde la decisión editorial inicial, se considerará como un nuevo envío.

La revista no realiza cargos por página. Una vez que el trabajo ha sido publicado, se envían 25 copias impresas del mismo al autor. También se proporcionará la versión en PDF del artículo.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

A. Editorial Policy

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* is a quarterly journal that publishes basic and applied research on pharmaceutical sciences and related areas.

2. A manuscript is accepted for consideration for publication with the understanding that it has not been published elsewhere (except in abstract form), that it is not concurrently under review elsewhere, that its publication has been approved by all the authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and the Publisher.

Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright.

The journal publishes articles written in Spanish or English.

3. An original, a copy, and the electronic version on CD of the manuscript should be sent with a cover letter to:

María Teresa Miras Portugal PhD.
Editor, ANALES DE LA REAL
ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
Real Academia Nacional de Farmacia
C/ Farmacia, 11
28004 Madrid
Spain
Fax: 91 531 03 06

To submit the manuscript electronically as an attachment use the E-mail: edicion@ranf.com. The text and the figures should be submitted in separate files. The accepted formats are: .doc (Word) for the text, and TIFF, JPG or PPT (Power Point) for figures.

4. Types of Manuscript.

The journal will consider and publish the following:

- **REVIEWS:** should be no longer than 4,000 words (excluding abstract, references, title page but including legends to figures and tables) and the reference list need not be exhaustive (no more than 40). While most reviews are invited by the Editors, authors interested in contributing reviews are requested to first contact the Editor.
- **ORIGINAL ARTICLES:** should be no longer than 4,000 words (excluding abstract, title page, and references, but including legends to figures and tables), and include no more than 40 references.
- **RAPID COMMUNICATIONS:** brief, definitive reports. The manuscript should be identified as such in the cover letter. The length should no longer than 2,500 words including references (no more than 10) and with a maximum of three figures/tables.
- **LETTERS TO THE EDITOR:** should be no longer than 1,000 words and include no more than three bibliographic references. Letters should focus on commenting or enlarge previous published articles, or deal with some aspects of educational or sanitary policy and pharmaceutical sciences.
- **ACADEMIC INFORMATION:** this section will inform about different courses, scientific sessions and others events that the journal deem appropriate.

B. Manuscript Organization

All elements of a manuscript should be double-spaced, and all pages must be numbered in the upper right corner, starting with the title page. Manuscripts describing original research should contain, in this order, the following elements:

1. TITLE PAGE**Title**

It must be in Spanish and in English. No more than 100 characters, not including spaces between words.

Author Names

The full names of all authors and their institutional affiliation. In a multi-authored work involving more than a single institution, indicate individual affiliation by means of a superscript Arabic number.

Keywords

Five keywords (in Spanish and in English) that do not appear in the title itself.

Contact Information

Name, address, telephone number, fax number, and e-mail address for author to whom proofs should be sent.

List of Abbreviations

Include the expansions and list in the order of their mention in the paper.

2. ABSTRACT PAGE

Should contain the summary in both Spanish and English. Write as continuous text organized as background and rationale for the study, main results, and conclusions. Do not exceed 250 words.

3. MANUSCRIPT SECTION**• INTRODUCTION**

Provide the minimum background information that will orient the general reader.

• MATERIAL AND METHODS (EXPERIMENTAL PROCEDURES)

Provide a level of detail such that another investigator could repeat the work; for methods that are used without significant modification,

citation of the original work will suffice.

Human Subjects

For reports of research using human subjects, provide assurance that (a) informed consent in writing was obtained from each patient and (b) the study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the appropriate institutional review committee. Refer to individual patients by number, not by initials.

Animal Experimentation

In studies involving animal experimentation, provide assurance that all animals received humane care according to the criteria outlined in the «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23 revised 1985).

Manufacturers

Include the names and locations (city and state or country) of manufacturers when mentioning proprietary drugs, tools, instruments, software, etc.

• RESULTS

Present the major findings of the study in graphic form if practicable. Do not illustrate minor details if their message is conveyed adequately by simple descriptive text. Mention all tables and figures.

• DISCUSSION

In the discussion, concisely present the implications of the new findings for the field as a whole, minimizing reiteration of the results, avoiding repetition of material in the introduction, and keeping a close focus on the specific topic of the paper.

• **ACKNOWLEDGMENT**

Acknowledge personal assistance and providers of special reagents. Grant and other financial support should be listed in this section.

• **REFERENCES**

These should be numbered in parentheses on the line, e.g. (7), or (11-13,17), in order of citation in the text. The list of references will be printed at the end of the paper. Articles may only be cited as «in press» if a copy of the acceptance notice is supplied at the time of submission. References should include the title of the article and be cited as follows:

Examples of journals (1) (2) and books (3) (4):

- (1) MacKINNON, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555: 62-65.
- (2) NIXON, J. E.; WANG, A.; MORRISON, H. G.; McARTHUR, A. G.; SOGIN, M. L.; LOFTUS, B. J. & SAMUELSON, J. (2002) A splicesomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 422-431.
- (3) LANGER, T. & NEUPERT, W. (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. in: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., Eds.), pp. 53-83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- (4) FELDMANN, H. (2004) Forty years of FEBS. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

• **TABLES**

Prepare tables on individual sheets of paper, double-spaced, and numbered consecutively with Arabic numerals in the order of their appearance in the text. Do not duplicate material presented in a figure.

• **FIGURE LEGENDS**

Number with Arabic numerals in the order mentioned in the text. Provide a title (this should not appear on the figure itself) and sufficient explanation to render the figure intelligible without reference to the text. Explain all abbreviations and symbols. Type figure legends consecutively on a separate sheet of paper.

• **FIGURES**

The Journal requires *one* set of figures. Mark the back of each figure in pencil with the figure number, its orientation, and the name of the first author.

Black and White

B/W figures are encouraged. Provide clean laser prints of black and white drawings and high-contrast glossy 18-cm-wide photographs of all halftone figures, e.g., photomicrographs, gels, etc.

Colour

Provide glossy prints in which lettering and symbols are clearly visible against the background. The Editor and the Editorial Committee will select the colour figures to be published.

As for the printed figures they should be contrasted, without colour background, and with possibility to appear in black and white in the printed version.

As indicated, if submission is carried out via e-mail, no printed figures are required.

PERMISSIONS

Direct quotations, tables, or illustrations taken from copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the publisher and the original author.

PEER REVIEW AND PUBLISHING

The Journal uses anonymous peer review in evaluating manuscripts for publication. The Editor will choose the appropriate reviewers for each manuscript. A manuscript requiring more than a single revision or returned

beyond 2 months of the date of the initial decision will be considered a new submission.

There are no page charges. Twenty-five offprints are provided free of charge to the corresponding author of each accepted article. The article in PDF version is also provided.



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

www.ranf.com