

REVISIONES

Central and peripheral endogenous morphine

Yannick Goumon^{*}, Alexis Laux, Arnaud Muller, Dominique Aunis

^{*} Inserm U575. Strasbourg, France.

Recibido el 28 de abril de 2009.

ABSTRACT

Morphine was first identified in opium from *Papaver somniferum*, and is still one of the strongest known analgesic compounds used in hospital. Since the beginning of the 80s, endogenous morphine, with an identical structure to that of morphine isolated from poppies, has been characterised in numerous mammalian cells and tissues. In mammals, the biosynthesis of endogenous morphine is associated with dopamine, as demonstrated in the SH-SY5Y human neuronal catecholamine-producing cell line. More recently, morphine and morphine-6-glucuronide has been shown to be present in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line and that morphine is secreted from the large dense core vesicles in response to nicotine stimulation *via* a Ca²⁺-dependent mechanism suggesting its implication in neurotransmission.

An increasing number of publications have demonstrated its presence and implication in different biological processes at the central and peripheral levels. The present review reports the major data concerning endogenous morphine presence and implication in physiological processes.

Key words: Morphine; Alkaloid; Morphine-6-Glucuronide; Analgesia; μ Opioid Receptor.

RESUMEN

Morfina endógena a nivel central y periférico

La morfina se identificó por primera vez en el opio procedente de *Papaver somniferum*, y sigue siendo uno de los analgésicos más potentes conocidos empleados en los hospitales. Desde comienzos de la década de los 80s, la morfina endógena, con una estructura idéntica a la morfina aislada de las amapolas, se caracterizó en numerosas células y tejidos de mamíferos. En mamíferos, la biosíntesis de la morfina endógena está asociada a la dopamina, como se ha demostrado en la línea celular neuronal humana productora de catecolaminas SH-SY5Y. Más recientemente, se ha demostrado la presencia de morfina y morfina-6-glucoronido en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y y que esta morfina es secretada desde vesículas densas en respuesta a estimulación con nicotina vía un mecanismo dependiente de Ca^{2+} sugiriendo su implicación en la neurotransmisión.

Un número cada vez mayor de publicaciones han demostrado su presencia e implicación en diferentes procesos biológicos a niveles central y periférico. La presente revisión recoge los datos más importantes sobre la presencia e implicación en procesos fisiológicos de la morfina endógena.

Palabras clave: Morfina; Alcaloide; Morfina-6-Glucoronido; Analgesia; Receptor opioide μ .

1. EXOGENOUS MORPHINE

a) History

When the capsule of the poppy *Papaver somniferum* is incised, a milky fluid exudes which, after harvesting and drying, yields a brown gum-like substance known as opium. Mention is made of this substance's efficacy as a painkiller, against diarrhoea and as a narcotic, in texts dating back as far as 4000 years BC. Morphine is one of the forty alkaloids present in opium (1) and today, its

analgesic activities—as well as its dangers addiction and overdose—are common knowledge. At this time, morphine and its precursor codeine remain the gold standard in pain relief (2, 3).

Morphine is still the most commonly used analgesic in hospitals, mainly to relieve acute pain (especially following surgery) but sometimes for chronic pain which is refractory to other active compounds. After administration (orally, subcutaneous or intravenous injection, or infusion), morphine has a half-life of about three hours. There is no recommended maximum dose and the amount administered can be progressively stepped up until pain relief is obtained, as long as there are no side effects: a typical daily dosage for chronic cancer pain in adults is 30 milligrams a day (administered by infusion). The analgesic activity is due to the binding of morphine to μ opiate receptors. Morphine often has unwanted side effects, including constipation, drowsiness, nausea and vomiting; other, less common side effects are confusion, nightmares and, at excessive doses, respiratory depression (which can cause apnoea and lead to death).

b) Mu (μ) opiate receptors

At the beginning of the 1970's, the existence of specific morphine-binding receptors was hypothesised on the basis of the drug's physiological effects, and soon such opiate receptors were indeed discovered in the central nervous system (4). Most opiates (alkaloids) and opioids (peptides) preferentially bind to Mu (μ), Delta (δ) and Kappa (κ) receptors, all proteins with seven membrane-crossing segments coupled to G proteins. Morphine and its derivative morphine-6-glucuronide (M6G) preferentially bind a receptor referred to as the Mu (μ) opiate receptor (MOR) or the Mu (μ) opioid peptide receptor [MOP (5)]. Like morphine, the endogenous peptide ligands, endomorphin-1 and endomorphin-2, have a high affinity for μ receptors (6). The extracellular N-terminal portion of the receptor molecule carries the ligand binding site while the intracellular C-terminal portion is involved in signal transduction (7). These receptors are found in both the central nervous system and the periphery. In the brain, the highest densities of μ receptors are found

in the thalamus, the putamen, the black substance, the cortex, the ventral tegmental zone, the nucleus accumbens and the amygdala (8, 9). In the periphery, μ receptors are expressed on endothelial cells (10, 11) and cells of the immune system (12), among others.

Pharmacological experiments and ligand binding studies have shown that there are several different isoforms of the μ receptor:

- μ_1 is mainly expressed in the CNS and has a high affinity for morphine -it is this form that mediates the drug's analgesic activity;
- μ_2 is expressed in the CNS, the respiratory system and the gut, and mediates most of the drug's side effects (3);
- μ_3 is found on human monocytes, granulocytes and endothelial cells.

However, whether or not these three different isoforms really exist is now controversial because all μ receptors are encoded by a single gene, *Opioid Receptor Mu 1 (OPRM1)* in humans and *Oprm1* in mice, and the different forms are generated by alternative splicing. Currently, 28 different variants have been described in mice (13, 14), and ten different forms have been characterised in humans (15). This classification system is continually changing and it is more than likely that other variants will be identified.

Signal transduction mechanisms of the μ receptors

The activation of Gi/Go proteins inhibits cellular activity by means of three main mechanisms [reviewed in (5)]:

- by inhibiting adenylate cyclase activity leading to a reduction in cAMP generation. However, it is important to remember that repeated exposure to morphine will lead to enhanced adenylate cyclase activity, a phenomenon which seems to contribute to the addictiveness of opiates (16);
- by opening potassium channels which leads to increased K^+ flux and hyperpolarisation of the cell (17);
- by blocking voltage-dependent calcium channels and decreasing permeability to Ca^{2+} (17).

Activating potassium channels at the same time as blocking voltage-dependent calcium channels inhibits neurotransmitter release so two typical effects of binding at μ receptors are, on the one hand reduced GABA release by hippocampal interneurons (18), and on the other reduced glutamate release by neurons in the striatum (19).

In addition to these three mechanisms, it has been shown that activation of μ receptors can affect other signalling pathways specific to other cell-types (20, 21), *e.g.* in endothelial cells and some types of immune cell (notably leukocytes). Thus, the stimulation of μ receptors induces the generation and release of nitrogen oxide (NO) *via* a PKC-dependent mechanism (1, 22, 23). Morphine's immunosuppressive activity seems to be dependent on μ receptor-mediated induction of a cascade of MAP kinases in lymphocytes and polymorphonuclear cells (24).

It has also been shown that GIRK (G-protein activated Inwardly Rectifying K^+ current) channels are involved in the analgesia induced by the bolus injection of morphine, especially through its action at the Periaqueductal gray matter (PAG): the drug inhibits GABAergic interneurons thereby lifting the inhibition of PAG neurons which are involved in descending control of nociception (25-27). Other experiments have shown that opiate inhibition of neurons in the dorsal layer of the spinal cord also involves GIRK channels. This mechanism underlies the analgesic effect obtained by injecting μ receptor agonists intrathecally (28, 29). Finally, recent work has revealed the role played by GIRK channels in tolerance and addiction when morphine is administered on a long-term basis (30, 31).

c) Morphine catabolism

Enzymes

Exogenous morphine is mainly inactivated (*i.e.* detoxified) in the liver by a superfamily of enzymes referred to as the UDP-glucuronosyltransferases [UGT (32)]. Different forms of UGT are found in the gut and kidneys [reviewed in (33)] and recently, the presence of UGT2B7 was found in the brain, suggesting that

endogenous and exogenous morphine could be glucuronized inside this organ (34, 35).

These various forms of UGT have distinct but overlapping substrate specificities. To date, 28 different UGT genes have been identified and these have been divided into two families and sub-families (UGT1, UGT2A and UGT2B) on the basis of their homology (36). Only certain of the known human UGTs appear to be catalytically active, namely UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2A1, 2B4, 2B7, 2B15, 2B17 and 2B28 (37, 38). In the liver, morphine is glucuronidated by a UGT at Carbon 3 or 6, to generate either morphine-3-glucuronide (M3G) or morphine-6-glucuronide (M6G; Figure 1), both highly hydrophilic compounds which are quickly excreted in the urine.

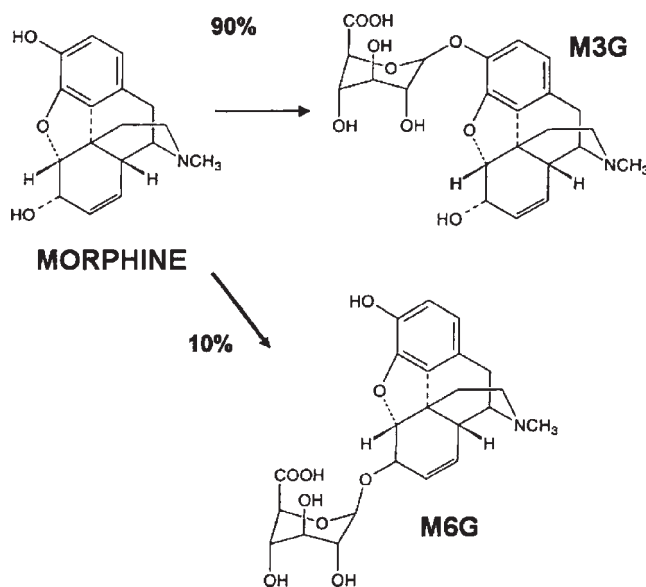


Figure 1. UGT2B7-catalysed generation of M3G and M6G from morphine in the liver.

M3G accounts for about 90% of the glucuronide products and has no analgesic activity at all (Figure 1). In contrast, M6G (the other 10% of morphine glucuronide products in the liver) is reported to be a more potent analgesic than the parent molecule [reviewed in: (32)].

In humans, most M6G and M3G formation is catalysed by UGT2B7, although UGT1A1 and 1A8 have been described as making a minor contribution to M6G (38), while UGT1A3, 1A6, 1A9 and 1A10 can only catalyse the formation of M3G (34). Most UGT enzymes are mainly expressed in the liver but some are found elsewhere, *e.g.* UGT1A6 and UGT2B7 are expressed in the brains of rats and humans (39), UGT1A6 is also expressed by rat neurones and astrocytes in primary tissue culture (40), and UGT1A6 has been detected by *in situ* hybridisation in pyramidal hippocampal neurones and Purkinje cells in the rat cerebellum (41).

In humans, M3G—the major glucuronide product of exogenous morphine—has zero affinity for opiate receptors and no analgesic activity (32). M6G—which accounts for 10% of the morphine breakdown products in the liver—can bind the μ receptor and has been reported as being 1-600 times more active as an analgesic than morphine itself, the variability depending on the model studied (notably species) and the route of administration [intraventricular, intravenous, etc.; reviewed in (2, 32-42)]. As well as these two glucuronides, smaller amounts of other metabolites are also formed and found in the urine, including morphine 3,6-diglucuronide, normorphine, normorphine-6-glucuronide and morphine-3-sulphate, with no or little analgesic activity (43, 44).

Before morphine or M6G can have any effect in the central nervous system, they have to cross the blood-brain barrier (BBB). M6G has been reported as crossing this barrier 32-57 less efficiently than morphine (45) and its analgesic effects are mainly obtained by intrathecal and intraventricular injection. Studies on the efficacy of M6G in humans have yielded inconsistent results. One study suggested that intrathecal M6G is 4-5 times more effective against postoperative pain (46) while a number of studies have indicated that very high doses of intravenous M6G are required for effective analgesia [reviewed in (3, 32)]. Because of its strongly hydrophilic nature, M6G does not cross the BBB efficiently and very high intravenous doses (of the order of 0.3 mg/kg) are necessary to reach a high enough M6G concentration in the brain for effective analgesia. In contrast to morphine, M6G analgesia seems to last longer [6-8 hours compared with just 2-4 hours (47)] and it induces fewer side effects, notably less vomiting and respiratory depression [reviewed

in (47)]. The longer-lasting action of M6G coupled with its lower incidence of adverse reactions make it a very promising analgesic. A number of clinical studies are currently underway to compare the analgesic activities of M6G and morphine in the management of postoperative pain (48).

2. ENDOGENOUS MORPHINE

a) History

In 1903, a French scientist, Dr. Mavrojannis, observed that, when he injected morphine into rats, they presented symptoms similar to those of a cataleptic attack (49). He hypothesised that an endogenous substance similar to morphine was present in the rat brain. However, it was necessary to wait for the improved detection methods of the 1970's —notably radioimmunoassay (RIA)— before a compound related to morphine could be detected in the brains of mice, rabbits and cats (50). This substance was not sensitive to proteases and had the same pharmacological receptor-binding profile as morphine. It was first called Morphine-Like Compound (MLC) (50) and was isolated from human cerebrospinal fluid (CSF), urine and brain extracts [prepared from patients who had never been given morphine (51)]. Subsequently, large quantities of MLC were purified from rabbit, rat and toad (*Bufo marinus*) epidermal tissue (52, 53). In 1985, Goldstein *et al.* purified a morphine-related compound from an extract of bovine hypothalamus and adrenal glands (54). Using chromatography and nuclear magnetic resonance (NMR), they showed that the substance was indeed morphine, with a structure identical to that of the plant molecule (54).

Subsequent experiments showed that this alkaloid could be found in the neural and immune cells of invertebrates (55). Endogenous alkaloids also seem to be produced by certain parasites, morphine having been detected in both *Schistosoma mansoni* (56) and *Ascaris suum* (57). Some scientists remained sceptical and believed that this morphine could have come from food: morphine had been detected in many plants (including hay and lettuce) as well as in cow's and human breast milk, at concentrations of between 200 and 500 ng/L (58). Experiments in livestock reared in strictly morphine-free

conditions, and in tissue cultures similarly depleted of any trace of morphine, showed that *de novo* endogenous morphine synthesis is a real phenomenon.

b) Synthesis of endogenous morphine

Definitive proof of the existence of endogenous morphine required demonstration of the *de novo* synthesis of the compound in mammalian cells. To do this, various intermediates in the synthesis of morphine were sought (Figure 2). Morphine and codeine were the first to be characterised (by mass spectrometry) in bovine hypothalamus, and then in rat brain extracts (59). Moreover, the injection of salutaridine, thebaine and codeine (three known intermediates in the plant synthetic pathway) led to rises in morphine levels in the rat brain (60). The conversion of reticuline to salutaridine by a cytochrome P-450 (an essential step in formation of the morphine skeleton) was also detected in rat liver (61) and then in microsome extracts from porcine liver tissue. It is interesting to note that higher levels of morphine and codeine can be detected in the urine of patients with Parkinson's disease on L-DOPA (62); in the brain, L-DOPA is decarboxylated to generate dopamine, an intermediate in the morphine synthetic pathway (Figure 2). Moreover, it was shown *in vivo* that mice whose tyrosine hydroxylase gene had been knocked out (tyrosine hydroxylase being necessary for dopamine formation) did not produce any endogenous morphine (63): morphine synthesis appears to depend on the presence of dopamine.

Incontrovertible proof that mammals synthesise morphine was provided by Zenk *et al.* in 2004 and 2005: when the cell line SH-SY5Y (derived from a human neuroblastoma) was cultured in the presence of $^{18}\text{O}_2$, the group were able to isolate a series of radiolabelled intermediates in the morphine synthetic pathway, as well as radiolabelled morphine [Figure 2 (64-66)]. Experiments with different radiolabelled precursors made it possible to define the entire pathway.

Most steps in the mammalian morphine synthetic pathway are the same as those in plants. The pathway begins with the

condensation of dopamine and 4-hydroxyphenylacetaldehyde (DOPAL), both of which are derivatives of tyrosine (64). This reaction proceeds spontaneously in an aqueous environment without catalysis. It is worth noting that the enzyme CYP2D6 is important because it is known to be involved in the formation of dopamine from tyramine, and the conversion of codeine to morphine (67). At this time, experimental results suggest that this enzyme is present in the liver, kidneys and immune cells (human white blood cells) (68). It seems that, as in plants, mammals have two ways of synthesising morphine from thebaine (Figure 2) although only a few of the enzymes actually involved in this pathway have been characterised and much information has been extrapolated from data about enzymes discovered in plants.

It is also worth noting that dopamine can be synthesised from tyramine through the action of DOPA decarboxylase/L-aromatic amino acid decarboxylase so the possibility that cells deficient in tyrosine hydroxylase (TH) could generate dopamine and therefore morphine cannot be ruled out. This is all the more likely given that TH-deficient neurones expressing DOPA decarboxylase (and therefore capable of producing morphine) have been described in different parts of the brain (69-73).

Recently, Bianchi *et al.* conducted experiments on conditional tyrosine hydroxylase knockout mice [i.e. in which expression of the gene is only abolished in central dopaminergic neurons (63)]. In the brains of conditional TH-/- mice, morphine was below the detection limit of the assay. However, the detection limit was relatively high and it cannot be excluded that some morphine was present; unfortunately, no immunohistochemical analysis was performed to complement these findings. In practice, non-dopaminergic/catecholaminergic cells such as those of the DAN-G line (pancreas) and HepG2 (hepatocytes) (66) are capable of producing morphine *de novo*, and it cannot be ruled out that morphine may also be synthesised by other cells in the central nervous system in a pathway dependent on DOPA decarboxylase or on an unknown enzyme rather than TH. In addition, it can also not be excluded that some particular cells are able to uptake morphine precursors (i.e. dopamine) to form morphine.

By means of immunohistochemical analysis, high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry, it has been

possible to characterise the presence of endogenous morphine unambiguously in various mammalian tissues, both central and peripheral.

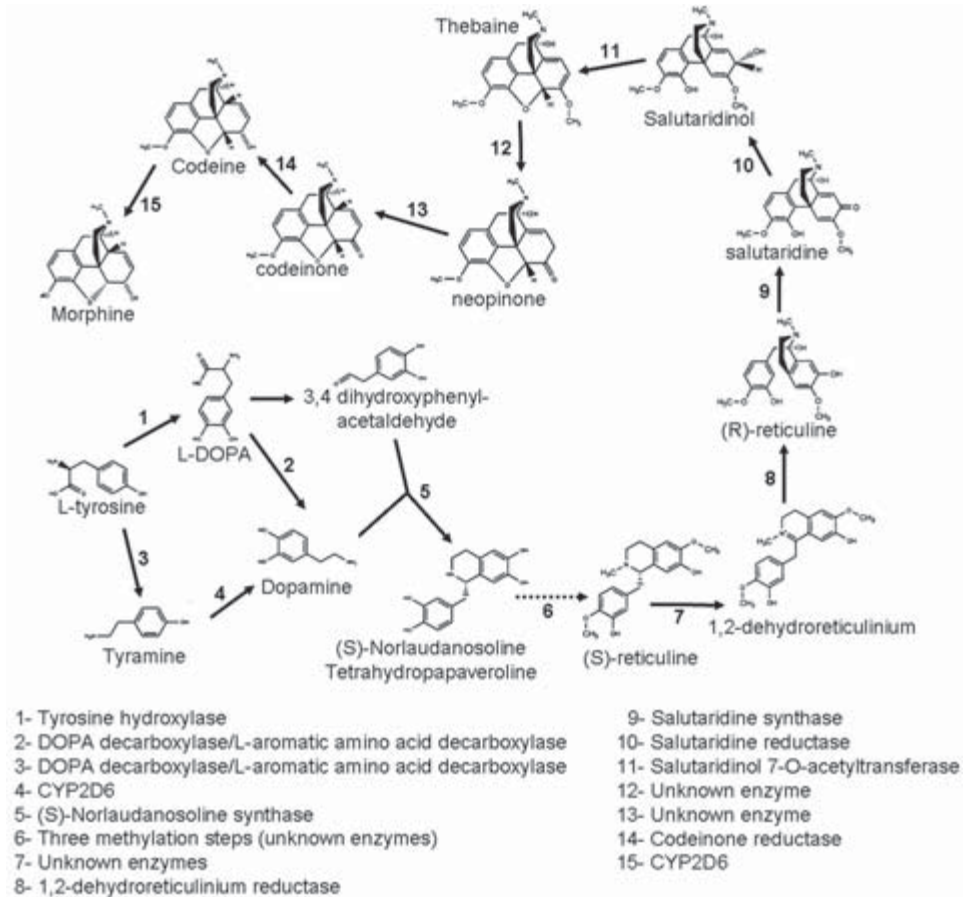


Figure 2. Intermediates on the morphine synthetic pathway in mammals: enzymes that may be involved. This synthetic pathway can take place in particular cells, but might also involve uptake of intermediates (e.g. dopamine) by other cells that will finish the morphine synthesis.

c) Endogenous morphine: localisation in the central nervous system and physiological functions

Maps of the brains of the dog and rat generated using various methods (HPLC and RIA) have shown the presence of morphine and/or its derivatives in neurones and nerve fibres (74, 75). In 1999, Meijerink *et al.* detected and quantified morphine in the thalamus, cortex, hypothalamus and cerebellum [Figure 3 (76)]. However, these experiments were conducted after 24 hours of fasting and fasting has been reported to increase the concentration of endogenous morphine in the brain (77). More recently, our group (78) was able to complete this work, characterizing morphine amounts present in the normal mouse brain (Figure 3). Moreover, morphine has also been detected in human cerebrospinal fluid (79). At the intracellular level, morphine has been detected in the cell bodies, axons and terminals of neurones in the putamen, hippocampus, hypothalamus, brain stem, cerebellum and spinal cord (74). Bianchi *et al.* have also shown that these neurones can accumulate tritiated morphine after intra-cerebroventricular infusion (74, 80), suggesting that these neurones have a system to uptake morphine.

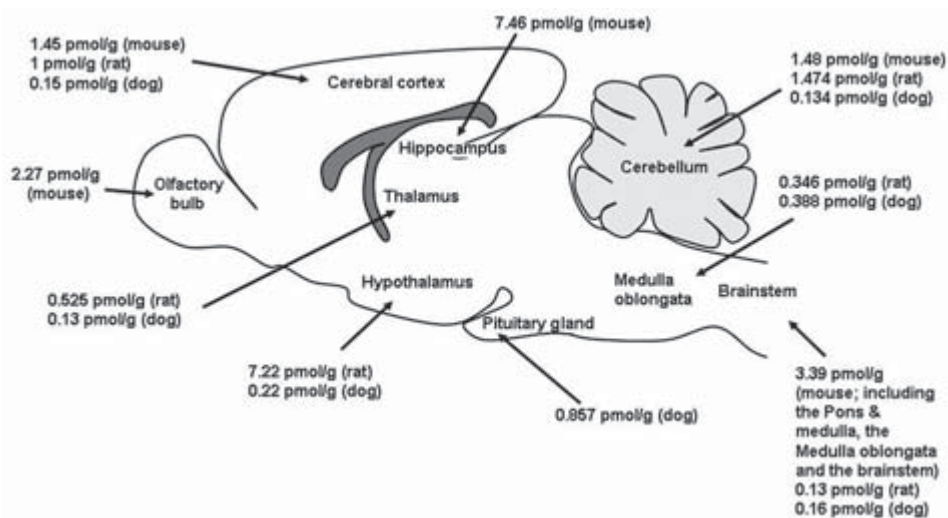


Figure 3. Cerebral distribution of endogenous morphine. Amounts of morphine present in the mouse (78), and in the fasting rat and dog (76).

Our recent studies have focused on the functional roles of endogenous morphine in the central nervous system (78). In experiments on the human neurone line SH-SY5Y [which is used to study neuronal secretion (81)], immunohistochemical analysis showed morphine/M6G/M3G (Figure 4) colocalizing with chromogranin A (CGA, a granular marker) in vesicle-like organelles with a dense core observed in certain neurons.

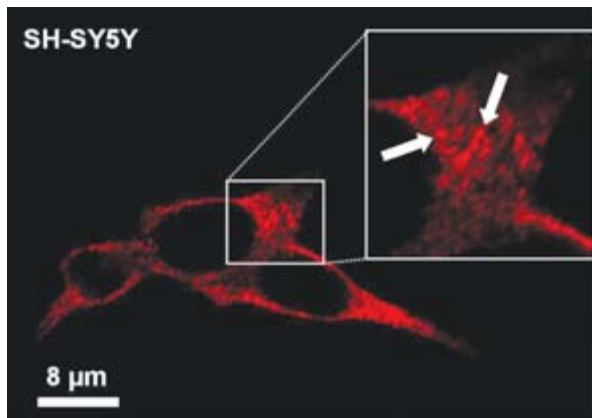


Figure 4. Confocal laser micrograph showing SH-SY5Y cells immunostained for morphine. Colocalisation highlighted in yellow.

Morphine and M6G were purified from SH-SY5Y cells and analysed by mass spectrometry. The identification of M6G pointed to the presence of UGT2B7 which is the main enzyme known to be able to convert morphine into this metabolite, and experiments based on RT-PCR and Western blotting showed, for the first time, that UGT2B7 was being expressed in these cells. Our experiments showed that morphine secretion by SH-SY5Y cells following nicotine-induced depolarisation was Ca^{2+} -dependent. Patch-clamping experiments showed that morphine and M6G could both induce naloxone-dependent electrophysiological responses at low concentrations (10^{-10} - 10^{-9}M).

In order to extend the observations made in the *in vitro* model, we looked for endogenous morphine in various parts of the brain of mice [which are reported not to produce M6G (82)] using microscopy

and a morphine-specific ELISA. This showed the presence of endogenous morphine in various places, including the hippocampus and the cerebellum (Figure 3 and Figure 5).

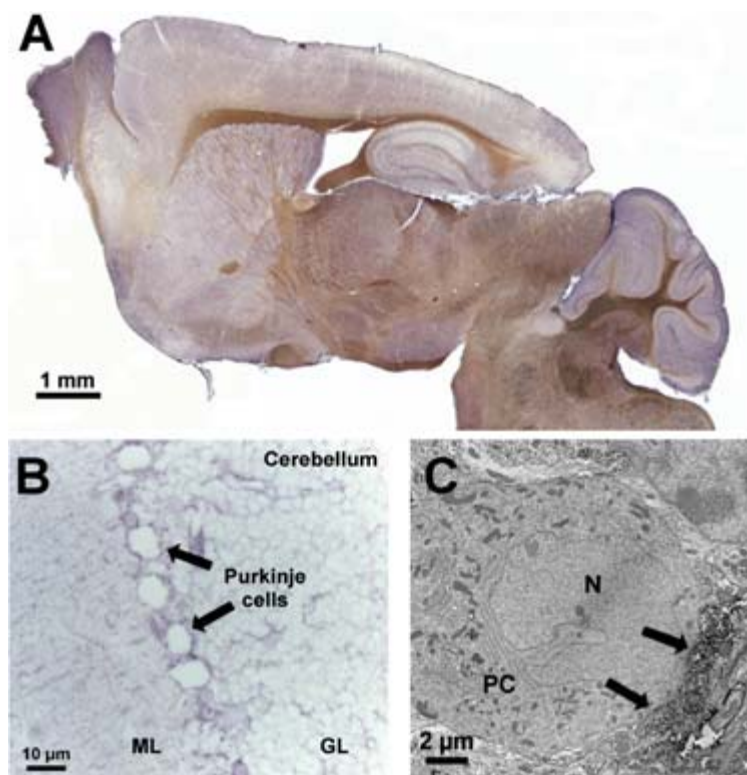


Figure 5. Localization of endogenous morphine present in the mouse brain. **A)** Immunodetection of endogenous morphine in the murine brain. The immunostaining was done with an antibody that recognises morphine and its glucuronidated derivatives. **B)** Localization of morphine label in the cerebellum using mouse monoclonal anti-morphine antibody and an HRP-conjugated secondary antibody. Morphine labelling was observed around Purkinje cells. ML, molecular layer; GL, granular layer. **C)** Electron micrograph (anti-morphine antibody) of murine cerebellum showing nerve terminals on the cell body of a Purkinje cell. The arrows indicate synaptic contacts with morphine-containing, presynaptic vesicles. PC, Purkinje cell; N, nucleus.

Focussing on the cerebellum, we showed a morphine immunohistochemical signal in basket cells (78) and their terminals synaps-

ing with the cell bodies of Purkinje cells (Figures 5B and C) which are reported as expressing μ receptors (83, 84).

Morphine in the nervous system

Various studies have pointed to the involvement of endogenous morphine in analgesia, memory, plasticity and development, as well as in the installation of addiction. A number of studies have described the effects of exogenous morphine in the CNS although, without an understanding of effective concentrations inside the synaptic cleft, it is difficult to speculate about the functions of endogenous morphine by extrapolating from results obtained with exogenous morphine. It is also likely that the level of endogenous morphine being produced and secreted varies with physiological conditions (notably stress). It is important to note that the concentrations used in most experiments (therapeutic doses) are often greater than 1 μ M. Nevertheless, on the basis of the observed effects of exogenous morphine coupled with an understanding of the distribution of endogenous morphine and its receptors in the CNS, hypotheses can be formulated about the physiological roles of endogenous morphine.

Endogenous morphine and nociception

An experiment conducted in the year 2000 showed that endogenous morphine colocalises with μ receptors in various parts of the brain stem. These include the locus coeruleus, the parabrachial nucleus, the periaqueductal grey substance and the nucleus raphe, all structures known to be involved in supraspinal nociception modulation (1). On the other hand, experiments carried out by Guarna *et al.* showed that the injection of antibodies directed against morphine into murine CSF (a procedure which lowers the level of endogenous morphine in the brain) induced hypersensitivity to heat-associated pain (85). Moreover, knockout mice which do not express μ receptors are abnormally sensitive to thermal stimuli but not to mechanical stimuli (86). These findings seem to suggest that endogenous morphine mainly modulates sensitivity to thermal pain.

It should also be noted that morphine seems to have paradoxical effects according to its concentration. One study showed that the subcutaneous injection of a small quantity of morphine (1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) induced hyperalgesia whereas high doses (1000-7000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) induced analgesia (87). These results are consistent with those of Robuvitch *et al.* who showed that DAMGO, a μ receptor agonist, stimulated cAMP production in the SK-N-SH cell line (derived from a neuroblastoma) at a concentration of 10 nM, but inhibited it at 0.1 μM (88). One of this group's hypotheses is that some nociceptive neurones could be expressing a low level of G protein-coupled μ receptors with a high affinity for morphine, and these could be mediating the hyperalgesia in the presence of low morphine concentrations; these same neurones would also be expressing classic μ receptors coupled with Gi/o proteins, to mediate the analgesia observed at the higher morphine concentration (89).

Endogenous morphine and memory

An experiment in which antibodies against morphine were injected into murine CSF pointed to a link between endogenous morphine and memorisation (90): after twelve hours of fasting, control mice showed deficient memorisation whereas memorisation processes were unaffected in the mice in which the level of endogenous morphine had been artificially depressed (*i.e.* neutralized by the antibodies). Endogenous morphine could therefore inhibit memorisation at times of stress (*e.g.* during starvation).

Exogenous morphine has been observed to have various effects on hippocampal function, the hippocampus being known to be a key structure in memorisation. Morphine is known to be able to modulate neurotransmission in the hippocampus by inhibiting its GABAergic interneurons. Such inhibition would result in an increase in the discharge amplitude of pyramidal neurons in the CA1 zone (91) and modify the efficacy of glutamatergic synapses by acting on the expression of proteins important for the post-synaptic density [*i.e.* receptors (92)]. Morphine would therefore act to consolidate memories by promoting long-term potentiation (LTP). However, other experiments have shown that prenatal exposure to

morphine impairs memorisation processes and reduces LTP at hippocampal synapses (93). Moreover, another experiment in rats showed that one-off exposure to high-dose morphine (10 mg/kg administered intraperitoneally) impaired memorisation in a cross-maze model. The effects of exogenous morphine on memorisation are therefore as yet poorly understood and seem to depend on both dosage and stage of development. In the light of all these observations and because both endogenous morphine and μ receptors are known to be present in the hippocampus, it could be that endogenous morphine plays a role in controlling memorisation functions.

Morphine, neurogenesis and the growth of nerve cells

In the brain of adult mammals, there are two sites of ongoing neurogenesis, namely the sub-ventricular zone (SVZ) along the edge of the lateral ventricle, and the sub-granular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus. Many contradictory results have been published on the effects of morphine on the multiplication of neuronal progenitors in the SGZ, reflecting the complexity of the underlying mechanisms [reviewed in (94)]. In rats and mice on long-term morphine (10 mg/kg administered intraperitoneally), neurogenesis has been observed to be decreased by a factor of over 30% in the SGZ (95, 96), whereas other experiments have shown that morphine stimulated multiplication (97, 98). Moreover, in μ receptor knock-out mice, an increase of over 50% was documented in the rate of survival of newly formed neurones in the granular zone of the dentate gyrus four weeks after the injection of bromodeoxyuridine [BrdU, a marker for neurogenesis (99)]. Endogenous morphine in the hippocampus (78) could therefore regulate the production and survival of neuronal progenitors, thereby affecting synaptic plasticity in the hippocampus. These data are supported by the results of clinical studies which point to hippocampal plasticity problems in heroin addicts (100).

With respect to cell growth, *in vitro* studies have shown that morphine has dose-dependent effects on the growth of neural processes (axons and dendrites) in cell lines and primary neurones in tissue culture: at high concentrations (10 mM-10 μ M), morphine

inhibited the growth of neuronal processes in primary cultures of hippocampal and cerebellar granule neurones in a naloxone-dependent fashion (101), whereas morphine concentrations of between 1 nM and 10 fM enhanced process growth in spinal cord and cortical neurones by a factor of over 20% (101), and a low concentration of morphine (10 pM) stimulated process elongation in PC-12 cells (102). These effects were not reversed by naloxone suggesting that they are mediated by special, high-affinity receptors.

In addition, a recent study showed that low doses of morphine had beneficial effects on synaptic regeneration and reconstruction at the nerve terminals of non-myelinated afferent fibres of the second lamina of the spinal cord following damage to the sciatic nerve (103).

Even more recent experiments described that low morphine concentrations (1-100 nM, 2 hours) significantly stimulated migration in rat microglial cells exposed to ATP (acting as a chemotactic agent) (104). Significant effects were observed from the concentration of 1 nM with peak activity observed at 100 nM. CTAP, a specific antagonist of μ receptors, inhibited this migration. These results suggest that endogenous morphine in the brain could modulate immune responses in the CNS.

Endogenous morphine and addiction

Experiments in two invertebrate models, *Mytilus edulis* and *Homarus americanus*, showed that exposure to addictive substances (ethanol, nicotine and cocaine) stimulates a two-fold increase in the release of endogenous morphine by the nervous system (105). A number of groups have postulated the existence of a link between endogenous morphine and addiction (106) although no experiments have yet been conducted in animals.

d) Localisation and physiological roles of endogenous morphine in the periphery

In the periphery, morphine has been detected in the liver and in a hepatocyte cell line (61, 66), and in the adrenal glands of a number

of mammalian species. The adrenal gland is one of the major organs involved in responses to stress and is composed of a cortical part (where glucocorticoids are produced) and a medullary part [mainly composed of chromaffin cells (107-109)]. Previously, morphine had also been found in PC-12 cells which are transformed rat chromaffin cells (66, 110), and in eel chromaffin cells (111). Chromaffin cells are neuroendocrine cells derived from the neural crest which are full of secretory granules containing catecholamines together with many different proteins and peptides, including chromogranins (107). In a stressful situation, chromaffin cell stimulation by the splanchnic nerve induces membrane depolarisation and degranulation which leads to emptying of catecholamines and the other granule contents into the blood stream. It is worth noting that the catecholamines (dopamine, adrenaline and noradrenaline) are all derived from dopamine and tyrosine precursors, as is morphine.

In experiments carried out in 2006 in a bovine chromaffin cell model, we detected M6G inside these cells' secretory granules (Figure 6). M6G secretion was also observed when nicotine was used to induce depolarisation in these cells in primary tissue culture. Because these chromaffin cells degranulate in response to stress, it is likely that M6G is secreted along with the catecholamines in such responses. Once in the circulation, the M6G could bind μ receptors on diverse cell types (immune cells, endothelial cells, etc.) and trigger physiological responses. We also showed that the M6G in chromaffin granules is stored as a complex with phosphatidylethanolamine-

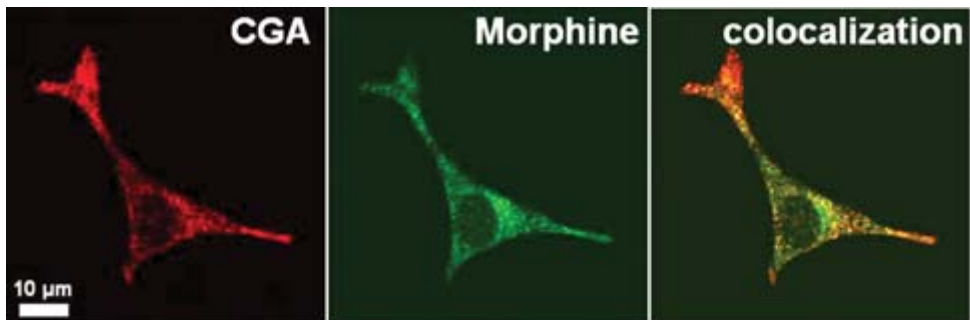


Figure 6. Confocal laser micrograph showing primary chromaffin cells in tissue culture cells labelled with antibodies against morphine and CGA (a granular marker). Colocalisation highlighted in yellow.

binding protein (PEBP) which would prevent it being cleared *via* the kidneys. Our findings also showed that, in the chromaffin cell model, M6G is the final product of the alkaloid synthesis pathway, and could represent a neuroendocrine effector.

A number of studies conducted on invertebrate immune cells have shown that morphine synthesis is stepped up at times of stress (55). More recently, a number of articles have reported that immune cells [notably polymorphonuclear cells and monocytes (68, 112)] synthesise morphine, pointing to a role in immune responses.

The intensive use of morphine in hospitals has spurred many studies focusing on the presence of morphine in the serum or plasma after the i.v. administration of exogenous morphine. In contrast to this body of work on exogenous morphine, there is little information about endogenous morphine in the blood although some findings suggest that endogenous morphine may play a role in stress and immune responses. Since the beginning of the 1990's, a number of studies on invertebrate immune cells had demonstrated morphine synthesis in response to stress (55). Three other studies conducted on pigs and patients who had undergone invasive surgery (*e.g.* coronary bypass surgery or laparotomy) showed elevated levels of endogenous morphine in the blood. Tonnesen *et al.* showed that coronary bypass surgery induced a rise in the amount of morphine in human serum from 0.28 nM to 3.9 nM (113-115) and, in another experiment, the same group measured a morphine concentration of about 10 nM in the blood of piglets who had undergone coronary bypass surgery while none was detectable in control animals (113). Finally, a human study suggested that the concentration of morphine in the blood was higher after open cholecystectomy than it was after laparoscopy (0.2 nM *versus* 0.018 nM) (115). Surgical procedures such as bypass surgery or thoracotomy elicit massive inflammation, *e.g.* the extracorporeal circulation associated with coronary bypass surgery always causes inflammation. Taken together, these observations point to a link between rises in blood morphine and inflammation. It is interesting to note that estimated IC₅₀'s for μ receptors [of the order of 10 nM (116)] are consistent with the levels observed in the circulation, suggesting that endogenous morphine may have effects on different cell types, including immune cells and endothelial cells.

The injection of lipopolysaccharide (LPS, an integral component of the cell walls of Gram-negative bacteria) into rats is used to study sepsis. In this system, LPS is known to induce an increase in the concentration of endogenous morphine in the adrenal glands (76) and brain (77). Other types of stress (like starvation) also induce rises in morphine levels in the spinal cord (76).

Morphine is known to be able to have immunosuppressant activity *via* various distinct mechanisms (117):

- (i) direct action on monocytes, macrophages and granulocytes: by inducing nitrogen oxide [NO (22)] and thereby inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines as well as chemotaxis and phagocytosis (116). On the other hand, the binding of morphine to μ receptors on endothelial cells also induces NO production and inhibits the expression of certain adhesion molecules involved in the recruitment of immune cells to sites of infection and inflammation;
- (ii) activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and release of immunosuppressive glucocorticoids (119);
- (iii) inhibition of the differentiation of stem cells into lymphocytes, and inhibition of T lymphocyte multiplication (120);
- (iv) inhibition of the cytolytic activity of NK cells (119-121): this has been observed after the direct injection of morphine into the cerebrospinal fluid, suggesting that the effect is mediated in the central nervous system.

The release of morphine in the blood could represent a physiological mechanism designed to mitigate over-exuberant inflammatory reactions. Morphine is also known to induce analgesia so it could, if present at high enough levels in the blood (113, 114) or brain (77) at times of stress, modulate the activity of peripheral nociceptors.

3. CONCLUSION

In summary, numerous studies have established a role for morphine as an endogenous signalling molecule. Thus, endogenous morphine appears to be both a neurotransmitter and endocrine

mediator playing a role in physiological processes. Investigation on endogenous morphine will continue to be an important axis of research and efforts will be focus on the characterization of its implication in physiology.

4. ACKNOWLEDGEMENT

This work was funded by Inserm, CNRS, the University Louis-Pasteur at Strasbourg, the Fondation de France (to Y.G), the French Ministère délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur (Ph.D fellowship to A.M. and A.L.), the Fondation Transplantation (to Y.G.) and the Fondation pour la Recherche Médicale (to Y.G.).

5. BIBLIOGRAPHY

1. Stefano, G. B., Goumon, Y., Casares, F., Cadet, P., Fricchione, G. L., Rialas, C., *et al.* (2000) Endogenous morphine. *Trends Neurosci.* 23(9): 436-442.
2. Lotsch, J. (2005) Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of opioids. *J. Pain Symptom. Manage.* 29(5 Suppl): S90-103.
3. Lotsch, J. & Geisslinger, G. (2001) Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin. Pharmacokinet.* 40(7): 485-499.
4. Pert, C. B., Pasternak, G. & Snyder, S. H. (1973) Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science.* 182(119): 1359-1361.
5. Trescot, A. M., Datta, S., Lee, M. & Hansen, H. (2008) Opioid pharmacology. *Pain Physician.* 11(2 Suppl): S133-153.
6. Zadina, J. E., Hackler, L., Ge, L. J. & Kastin, A. J. (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature.* 386(6624): 499-502.
7. Zhang, Y., Chen, Q. & Yu, L. C. (2008) Morphine: a protective or destructive role in neurons? *Neuroscientist.* 14(6): 561-570.
8. Ding, Y. Q., Kaneko, T., Nomura, S. & Mizuno, N. (1996) Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 367(3): 375-402.
9. Mansour, A., Fox, C. A., Burke, S., Akil, H. & Watson, S. J. (1995) Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J. Chem. Neuroanat.* 8(4): 283-305.
10. Bianchi, C., Sellke, F. W., Del Vecchio, R. L., Tonks, N. K. & Neel, B. G. (1999) Receptor-type protein-tyrosine phosphatase mu is expressed in specific vascular endothelial beds in vivo. *Exp. Cell Res.* 248(1): 329-338.

11. Vidal, E. L., Patel, N. A., Wu, G., Fiala, M. & Chang, S. L. (1998) Interleukin-1 induces the expression of mu opioid receptors in endothelial cells. *Immunopharmacology*. 38(3): 261-266.
12. McCarthy, L., Wetzel, M., Sliker, J. K., Eisenstein, T. K. & Rogers, T. J. (2001) Opioids, opioid receptors, and the immune response. *Drug Alcohol Depend.* 62(2): 111-123.
13. Doyle, G. A., Sheng, X. R., Lin, S. S., Press, D. M., Grice, D. E., Buono, R. J., *et al.* (2007) Identification of five mouse mu-opioid receptor (MOR) gene (Oprm1) splice variants containing a newly identified alternatively spliced exon. *Gene*. 395(1-2): 98-107.
14. Xu, J., Xu, M., Hurd, Y. L., Pasternak, G. W. & Pan, Y. X. (2009) Isolation and characterization of new exon 11-associated N-terminal splice variants of the human mu opioid receptor gene. *J. Neurochem.* 108(4): 962-972.
15. Pan, Y. X. (2005) Diversity and complexity of the mu opioid receptor gene: alternative pre-mRNA splicing and promoters. *DNA Cell Biol.* 24(11): 736-750.
16. Nevo, I., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Bayewitch, M. & Vogel, Z. (2000) Acute and chronic activation of the mu-opioid receptor with the endogenous ligand endomorphin differentially regulates adenylyl cyclase isozymes. *Neuropharmacology*. 39(3): 364-371.
17. Williams, J. T., Christie, M. J. & Manzoni, O. (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.* 81(1): 299-343.
18. Cohen, G. A., Doze, V. A. & Madison, D. V. (1992) Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal interneurons. *Neuron*. 9(2): 325-335.
19. Jiang, Z. G. & North, R. A. (1991) Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro. *J. Physiol.* 443: 533-553.
20. Connor, M. & Henderson, G. (1996) delta- and mu-opioid receptor mobilization of intracellular calcium in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Br. J. Pharmacol.* 117(2): 333-340.
21. Tang, Y., Chen, K. X., Jiang, H. L., Wang, Z. X., Ji, R. Y. & Chi, Z. Q. (1996) Molecular modeling of mu opioid receptor and its interaction with ohmefentanyl. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 17(2): 156-160.
22. Pasternak, G. W. (2007) When it comes to opiates, just say NO. *J. Clin. Invest.* 117(11): 3185-3187.
23. Stefano, G. B., Goumon, Y., Bilfinger, T. V., Welters, I. D. & Cadet, P. (2000) Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu opiate receptor. *Prog. Neurobiol.* 60(6): 513-530.
24. Chuang, L. F., Killam, K. F., Jr. & Chuang, R. Y. (1997) Induction and activation of mitogen-activated protein kinases of human lymphocytes as one of the signaling pathways of the immunomodulatory effects of morphine sulfate. *J. Biol. Chem.* 272(43): 26815-26817.
25. Ikeda, K., Kobayashi, T., Kumanishi, T., Niki, H. & Yano, R. (2000) Involvement of G-protein-activated inwardly rectifying K (GIRK) channels in opioid-induced analgesia. *Neurosci. Res.* 38(1): 113-116.

26. Marker, C. L., Stoffel, M. & Wickman, K. (2004) Spinal G-protein-gated K⁺ channels formed by GIRK1 and GIRK2 subunits modulate thermal nociception and contribute to morphine analgesia. *J. Neurosci.* 24(11): 2806-2812.
27. Vaughan, C. W., Bagley, E. E., Drew, G. M., Schuller, A., Pintar, J. E., Hack, S. P., *et al.* (2003) Cellular actions of opioids on periaqueductal grey neurons from C57B16/J mice and mutant mice lacking MOR-1. *Br. J. Pharmacol.* 139(2): 362-367.
28. Marker, C. L., Lujan, R., Loh, H. H. & Wickman, K. (2005) Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids. *J. Neurosci.* 25(14): 3551-3559.
29. Nakatsuka, T., Fujita, T., Inoue, K. & Kumamoto, E. (2008) Activation of GIRK channels in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord: a possible involvement of somatostatin. *J. Physiol.* 586(10): 2511-2522.
30. Cruz, H. G., Berton, F., Sollini, M., Blanchet, C., Pravetoni, M., Wickman, K., *et al.* (2008) Absence and rescue of morphine withdrawal in GIRK/Kir3 knock-out mice. *J. Neurosci.* 28(15): 4069-4077.
31. Torrecilla, M., Quillinan, N., Williams, J. T. & Wickman, K. (2008) Pre- and postsynaptic regulation of locus coeruleus neurons after chronic morphine treatment: a study of GIRK-knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 28(3): 618-624.
32. Coller, J. K., Christrup, L. L. & Somogyi, A. A. (2008) Role of active metabolites in the use of opioids. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*
33. Ohno, S. & Nakajin, S. (2009) Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab. Dispos.* 37(1): 32-40.
34. Radomska-Pandya, A., Little, J. M. & Czernik, P. J. (2001) Human UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Curr. Drug Metab.* 2(3): 283-298.
35. Yamada, H., Ishii, K., Ishii, Y., Ieiri, I., Nishio, S., Morioka, T., *et al.* (2003) Formation of highly analgesic morphine-6-glucuronide following physiologic concentration of morphine in human brain. *J. Toxicol. Sci.* 28(5): 395-401.
36. Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., *et al.* (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics.* 7(4): 255-269.
37. Mackenzie, P. I., Walter Bock, K., Burchell, B., Guillemette, C., Ikushiro, S., Iyanagi, T., *et al.* (2005) Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet. Genomics.* 15(10): 677-685.
38. Ohno, S., Kawana, K. & Nakajin, S. (2008) Contribution of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and 1A8 to morphine-6-glucuronidation and its kinetic properties. *Drug Metab. Dispos.* 36(4): 688-694.
39. King, C. D., Rios, G. R., Assouline, J. A. & Tephly, T. R. (1999) Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain

- and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 365(1): 156-162.
40. Suleman, F. G., Abid, A., Gradinaru, D., Daval, J. L., Magdalou, J. & Minn, A. (1998) Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 358(1): 63-67.
 41. Brands, A., Munzel, P. A. & Bock, K. W. (2000) In situ hybridization studies of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 expression in rat testis and brain. *Biochem. Pharmacol.* 59(11): 1441-1444.
 42. Lotsch, J. (2005) Opioid metabolites. *J. Pain Symptom. Manage.* 29(5 Suppl): S10-24.
 43. Yeh, S. Y., Gorodetzky, C. W. & Krebs, H. A. (1977) Isolation and identification of morphine 3- and 6-glucuronides, morphine 3,6-diglucuronide, morphine 3-etheral sulfate, normorphine, and normorphine 6-glucuronide as morphine metabolites in humans. *J. Pharm. Sci.* 66(9): 1288-1293.
 44. Zheng, M., McErlane, K. M. & Ong, M. C. (1998) High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry analysis of morphine and morphine metabolites and its application to a pharmacokinetic study in male Sprague-Dawley rats. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16(6): 971-980.
 45. Wu, D., Kang, Y. S., Bickel, U. & Pardridge, W. M. (1997) Blood-brain barrier permeability to morphine-6-glucuronide is markedly reduced compared with morphine. *Drug Metab Dispos.* 25(6): 768-771.
 46. Grace, D. & Fee, J. P. (1996) A comparison of intrathecal morphine-6-glucuronide and intrathecal morphine sulfate as analgesics for total hip replacement. *Anesth. Analg.* 83(5): 1055-1059.
 47. Dahan, A., van Dorp, E., Smith, T. & Yassen, A. (2008) Morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief. *Eur. J. Pain.* 12(4): 403-411.
 48. van Dorp, E. L., Romberg, R., Sarton, E., Bovill, J. G. & Dahan, A. (2006). Morphine-6-Glucuronide: Morphine's Successor for Postoperative Pain Relief? *Anesth. Analg.* 102(6): 1789-1797.
 49. Mavrojanis, M. (1903) Action Cataleptique de la Morphine chez les Rats. Contribution a la Theorie Toxique da la Catalepsie. *Comptes rendues Soc. Biol.* 55: 1092-1094.
 50. Gintzler, A. R., Mohacsi, E. & Spector, S. (1976) Radioimmunoassay for the simultaneous determination of morphine and codeine. *Eur. J. Pharmacol.* 38(1): 149-156.
 51. Shorr, J., Foley, K. & Spector, S. (1978) Presence of a non-peptide morphine-like compound in human cerebrospinal fluid. *Life Sci.* 23(20): 2057-2062.
 52. Oka, K., Kantrowitz, J. D. & Spector, S. (1985) Isolation of morphine from toad skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82(6): 1852-1854.
 53. Spector, S., Kantrowitz, J. D. & Oka, K. (1985) Presence of endogenous morphine in toad skin. *Prog. Clin. Biol. Res.* 192: 329-332.
 54. Goldstein, A., Barrett, R. W., James, I. F., Lowney, L. I., Weitz, C. J., Knipmeyer, L. L., *et al.* (1985) Morphine and other opiates from beef brain and adrenal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82(15): 5203-5207.

55. Stefano, G. B., Digenis, A., Spector, S., Leung, M. K., Bilfinger, T. V., Makman, M. H., *et al.* (1993) Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(23): 11099-11103.
56. Leung, M. K., Dissous, C., Capron, A., Woldegaber, H., Duvaux-Miret, O., Pryor, S., *et al.* (1995) *Schistosoma mansoni*: the presence and potential use of opiate-like substances. *Exp. Parasitol.* 81(2): 208-215.
57. Goumon, Y., Casares, F., Pryor, S., Ferguson, L., Brownawell, B., Cadet, P., *et al.* (2000) *Ascaris suum*, an intestinal parasite, produces morphine. *J. Immunol.* 165(1): 339-343.
58. Hazum, E., Sabatka, J. J., Chang, K. J., Brent, D. A., Findlay, J. W. & Cuatrecasas, P. (1981) Morphine in cow and human milk: could dietary morphine constitute a ligand for specific morphine (μ) receptors? *Science.* 213(4511): 1010-1012.
59. Weitz, C. J., Lowney, L. I., Faull, K. F., Feistner, G. & Goldstein, A. (1986) Morphine and codeine from mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83(24): 9784-9788.
60. Donnerer, J., Oka, K., Brossi, A., Rice, K. C. & Spector, S. (1986) Presence and formation of codeine and morphine in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83(12): 4566-4567.
61. Weitz, C. J., Faull, K. F. & Goldstein, A. (1987) Synthesis of the skeleton of the morphine molecule by mammalian liver. *Nature.* 330(6149): 674-677.
62. Matsubara, K., Fukushima, S., Akane, A., Kobayashi, S. & Shiono, H. (1992) Increased urinary morphine, codeine and tetrahydropapaveroline in parkinsonian patient undergoing L-3,4-dihydroxyphenylalanine therapy: a possible biosynthetic pathway of morphine from L-3,4-dihydroxyphenylalanine in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260(3): 974-978.
63. Neri, C., Ghelardini, C., Sotak, B., Palmiter, R. D., Guarna, M., Stefano, G., *et al.* (2008) Dopamine is necessary to endogenous morphine formation in mammalian brain *in vivo*. *J. Neurochem.* 106(6): 2337-2344.
64. Boettcher, C., Fellermeier, M., Boettcher, C., Drager, B. & Zenk, M. H. (2005). How human neuroblastoma cells make morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(24): 8495-8500.
65. Poeaknapo, C. (2005) Mammalian morphine: de novo formation of morphine in human cells. *Med. Sci. Monit.* 11(5): MS6-17.
66. Poeaknapo, C., Schmidt, J., Brandsch, M., Drager, B. & Zenk, M. H. (2004) Endogenous formation of morphine in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(39): 14091-14096.
67. Zhu, W., Mantione, K. J., Shen, L., Cadet, P., Esch, T., Goumon, Y., *et al.* (2005) Tyrosine and tyramine increase endogenous ganglionic morphine and dopamine levels *in vitro* and *in vivo*: cyp2d6 and tyrosine hydroxylase modulation demonstrates a dopamine coupling. *Med. Sci. Monit.* 11(11): BR397-404.
68. Zhu, W., Cadet, P., Baggerman, G., Mantione, K. J. & Stefano, G. B. (2005) Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation. *J. Immunol.* 175(11): 7357-7362.

69. Baker, H., Abate, C., Szabo, A. & Joh, T. H. (1991) Species-specific distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase in the rodent adrenal gland, cerebellum, and olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 305(1): 119-129.
70. Ikemoto, K., Kitahama, K., Jouvet, A., Arai, R., Nishimura, A., Nishi, K., *et al.* (1997) Demonstration of L-dopa decarboxylating neurons specific to human striatum. *Neurosci. Lett.* 232(2): 111-114.
71. Ikemoto, K., Kitahama, K., Nishimura, A., Jouvet, A., Nishi, K., Arai, R., *et al.* (1999) Tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase do not coexist in neurons in the human anterior cingulate cortex. *Neurosci. Lett.* 269(1): 37-40.
72. Kitahama, K., Geffard, M., Araneda, S., Arai, R., Ogawa, K., Nagatsu, I., *et al.* (2007) Localization of L-DOPA uptake and decarboxylating neuronal structures in the cat brain using dopamine immunohistochemistry. *Brain Res.* 1167: 56-70.
73. Ugrumov, M. V., Melnikova, V. I., Lavrentyeva, A. V., Kudrin, V. S. & Rayevsky, K. S. (2004) Dopamine synthesis by non-dopaminergic neurons expressing individual complementary enzymes of the dopamine synthetic pathway in the arcuate nucleus of fetal rats. *Neuroscience.* 124(3): 629-635.
74. Bianchi, E., Alessandrini, C., Guarna, M. & Tagliamonte, A. (1993) Endogenous codeine and morphine are stored in specific brain neurons. *Brain Res.* 627(2): 210-215.
75. Bianchi, E., Guarna, M. & Tagliamonte, A. (1994) Immunocytochemical localization of endogenous codeine and morphine. *Adv. Neuroimmunol.* 4(2): 83-92.
76. Meijerink, W. J., Molina, P. E. & Abumrad, N. N. (1999) Mammalian opiate alkaloid synthesis: lessons derived from plant biochemistry. *Shock.* 12(3): 165-173.
77. Goumon, Y., Bouret, S., Casares, F., Zhu, W., Beauvillain, J. C. & Stefano, G. B. (2000) Lipopolysaccharide increases endogenous morphine levels in rat brain. *Neurosci. Lett.* 293(2): 135-138.
78. Muller, A., Glattard, E., Taleb, O., Kemmel, V., Laux, A., Miehe, M., *et al.* (2008) Endogenous Morphine in SH-SY5Y Cells and the Mouse Cerebellum. *PLoS One.* 3(2): Epub www.plosone.org/doi/pone.0001641.
79. Cardinale, G. J., Donnerer, J., Finck, A. D., Kantrowitz, J. D., Oka, K. & Spector, S. (1987) Morphine and codeine are endogenous components of human cerebrospinal fluid. *Life Sci.* 40(3): 301-306.
80. Guarna, M., Neri, C., Petrioli, F. & Bianchi, E. (1998) Potassium-induced release of endogenous morphine from rat brain slices. *J. Neurochem.* 70(1): 147-152.
81. Agis-Torres, A., Ball, S. G. & Vaughan, P. F. (2002) Chronic treatment with nicotine or potassium attenuates depolarisation-evoked noradrenaline release from the human neuroblastoma SH-SY5Y. *Neurosci. Lett.* 331(3): 167-170.
82. van Dorp, E. L., Morariu, A. & Dahan, A. (2008) Morphine-6-glucuronide: potency and safety compared with morphine. *Expert Opin. Pharmacother.* 9(11): 1955-1961.

83. Mrkusich, E. M., Kivell, B. M., Miller, J. H. & Day, D. J. (2004) Abundant expression of mu and delta opioid receptor mRNA and protein in the cerebellum of the fetal, neonatal, and adult rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 148(2): 213-222.
84. Zhang, Y., Pan, Y. X., Kolesnikov, Y. & Pasternak, G. W. (2006) Immunohistochemical labeling of the mu opioid receptor carboxy terminal splice variant mMOR-1B4 in the mouse central nervous system. *Brain Res.* 1099(1): 33-43.
85. Guarna, M., Bianchi, E., Bartolini, A., Ghelardini, C., Galeotti, N., Bracci, L., *et al.* (2002) Endogenous morphine modulates acute thermoreception in mice. *J. Neurochem.* 80(2): 271-277.
86. Kieffer, B. L. & Gaveriaux-Ruff, C. (2002) Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog. Neurobiol.* 66(5): 285-306.
87. Galeotti, N., Stefano, G. B., Guarna, M., Bianchi, E. & Ghelardini, C. (2006) Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperalgesia in mice. *Pain.* 123(3): 294-305.
88. Rubovitch, V., Gafni, M. & Sarne, Y. (2003) The mu opioid agonist DAMGO stimulates cAMP production in SK-N-SH cells through a PLC-PKC-Ca⁺⁺ pathway. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 110(2): 261-266.
89. Crain, S. M. & Shen, K. F. (2001) Acute thermal hyperalgesia elicited by low-dose morphine in normal mice is blocked by ultra-low-dose naltrexone, unmasking potent opioid analgesia. *Brain Res.* 888(1): 75-82.
90. Guarna, M., Ghelardini, C., Galeotti, N., Bartolini, A., Noli, L., Neri, C., *et al.* (2004) Effects of endogenous morphine deprivation on memory retention of passive avoidance learning in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 7(3): 311-319.
91. Miller, K. K. & Lupica, C. R. (1997) Neuropeptide FF inhibition of morphine effects in the rat hippocampus. *Brain Res.* 750(1-2): 81-86.
92. Moron, J. A., Abul-Husn, N. S., Rozenfeld, R., Dolios, G., Wang, R. & Devi, L. A. (2007) Morphine administration alters the profile of hippocampal postsynaptic density-associated proteins: a proteomics study focusing on endocytic proteins. *Mol. Cell. Proteomics.* 6(1): 29-42.
93. Niu, L., Cao, B., Zhu, H., Mei, B., Wang, M., Yang, Y., *et al.* (2008) Impaired in vivo synaptic plasticity in dentate gyrus and spatial memory in juvenile rats induced by prenatal morphine exposure. *Hippocampus.*
94. Sargeant, T. J., Day, D. J., Mrkusich, E. M., Foo, D. F. & Miller, J. H. (2007) Mu opioid receptors are expressed on radial glia but not migrating neuroblasts in the late embryonic mouse brain. *Brain Res.* 1175: 28-38.
95. Eisch, A. J., Barrot, M., Schad, C. A., Self, D. W. & Nestler, E. J. (2000) Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(13): 7579-7584.
96. Mandyam, C. D., Norris, R. D. & Eisch, A. J. (2004) Chronic morphine induces premature mitosis of proliferating cells in the adult mouse subgranular zone. *J. Neurosci. Res.* 76(6), 783-794

97. Persson, A. I., Thorlin, T., Bull, C. & Eriksson, P. S. (2003) Opioid-induced proliferation through the MAPK pathway in cultures of adult hippocampal progenitors. *Mol. Cell. Neurosci.* 23(3): 360-372.
98. Persson, A. I., Thorlin, T., Bull, C., Zarnegar, P., Ekman, R., Terenius, L., *et al.* (2003) Mu- and delta-opioid receptor antagonists decrease proliferation and increase neurogenesis in cultures of rat adult hippocampal progenitors. *Eur. J. Neurosci.* 17(6): 1159-1172.
99. Harburg, G. C., Hall, F. S., Harrist, A. V., Sora, I., Uhl, G. R. & Eisch, A. J. (2007) Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. *Neuroscience.* 144(1): 77-87.
100. Weber, M., Modemann, S., Schipper, P., Trauer, H., Franke, H., Illes, P., *et al.* (2006) Increased polysialic acid neural cell adhesion molecule expression in human hippocampus of heroin addicts. *Neuroscience.* 138(4): 1215-1223.
101. Brailoiu, E., Hoard, J., Brailoiu, G. C., Chi, M., Godbolde, R. & Dun, N. J. (2004) Ultra low concentrations of morphine increase neurite outgrowth in cultured rat spinal cord and cerebral cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 365(1): 10-13.
102. Tenconi, B., Lesma, E., DiGiulio, A. M. & Gorio, A. (1996) High opioid doses inhibit whereas low doses enhance neuritogenesis in PC12 cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 94(2): 175-181.
103. Zeng, Y. S., Nie, J. H., Zhang, W., Chen, S. J. & Wu, W. (2007) Morphine acts via mu-opioid receptors to enhance spinal regeneration and synaptic reconstruction of primary afferent fibers injured by sciatic nerve crush. *Brain Res.* 1130(1): 108-113.
104. Horvath, R. J. & DeLeo, J. A. (2009) Morphine enhances microglial migration through modulation of P2X4 receptor signaling. *J. Neurosci.* 29(4): 998-1005.
105. Zhu, W., Mantione, K. J., Casares, F. M., Cadet, P., Kim, J. W., Bilfinger, T. V., *et al.* (2006) Alcohol-, nicotine-, and cocaine-evoked release of morphine from invertebrate ganglia: model system for screening drugs of abuse. *Med. Sci. Monit.* 12(5): BR155-161.
106. Stefano, G. B., Bianchi, E., Guarna, M., Fricchione, G. L., Zhu, W., Cadet, P., *et al.* (2007) Nicotine, alcohol and cocaine coupling to reward processes via endogenous morphine signaling: the dopamine-morphine hypothesis. *Med. Sci. Monit.* 13(6): RA91-102.
107. Aunis, D. (1998) Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int. Rev. Cytol.* 181: 213-320.
108. Aunis, D., Miras-Portugal, M. T. & Mandel, P. (1974) Bovine adrenal medullary dopamine-beta-hydroxylase: studies on the structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 365: 259-273.
109. Aunis, D., Miras-Portugal, M. T. & Mandel, P. (1975) Bovine adrenal medullary dopamine-beta-hydroxylase: studies on interaction with concanavalin A. *J. Neurochem.* 24: 425-431.
110. Goumon, Y., Zhu, W., Weeks, B. S., Casares, F., Cadet, P., Bougaeva, M., *et al.* (2000) Identification of morphine in the adrenal medullary chromaffin PC-12 cell line. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 81(1-2): 177-180.

111. Epple, A., Navarro, I., Horak, P. & Spector, S. (1993) Endogenous morphine and codeine: release by the chromaffin cells of the eel. *Life Sci.* 52(16): PL117-121.
112. Boettcher, C., Fischer, W. & Zenk, M. H. (2006) Comment on «Human White Blood Cells Synthesize Morphine: CYP2D6 Modulation». *J. Immunol.* 176(10): 5703-5704.
113. Brix-Christensen, V., Goumon, Y., Tonnesen, E., Chew, M., Bilfinger, T. & Stefano, G. B. (2000) Endogenous morphine is produced in response to cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 44(10): 1204-1208.
114. Brix-Christensen, V., Tonnesen, E., Sánchez, R. G., Bilfinger, T. V. & Stefano, G. B. (1997) Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response? *Int. J. Cardiol.* 62(3): 191-197.
115. Yoshida, S., Ohta, J., Yamasaki, K., Kamei, H., Harada, Y., Yahara, T., *et al.* (2000) Effect of surgical stress on endogenous morphine and cytokine levels in the plasma after laparoscopic or open cholecystectomy. *Surg. Endosc.* 14(2): 137-140.
116. Pan, Y. X., Xu, J., Bolan, E., Moskowitz, H. S., Xu, M. & Pasternak, G. W. (2005) Identification of four novel exon 5 splice variants of the mouse mu-opioid receptor gene: functional consequences of C-terminal splicing. *Mol. Pharmacol.* 68(3): 866-875.
117. Sharp, B. M., Roy, S. & Bidlack, J. M. (1998) Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. *J. Neuroimmunol.* 83(1-2): 45-56.
118. Dinda, A., Gitman, M. & Singhal, P. C. (2005) Immunomodulatory effect of morphine: therapeutic implications. *Expert. Opin. Drug. Saf.* 4(4): 669-675.
119. Mellon, R. D. & Bayer, B. M. (1998) Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action. *J. Neuroimmunol.* 83(1-2): 19-28.
120. Mellon, R. D. & Bayer, B. M. (1998) Role of central opioid receptor subtypes in morphine-induced alterations in peripheral lymphocyte activity. *Brain Res.* 789(1): 56-67.
121. Mellon, R. D. & Bayer, B. M. (1999) The effects of morphine, nicotine and epibatidine on lymphocyte activity and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288(2): 635-642.

*** Address Correspondence:**

Dr. Yannick Goumon.

Inserm U575; 5, Rue Blaise Pascal. F-67084-
Strasbourg Cedex, France.

Phone: (33) 3 88 45 67 18. Fax: (33) 3 88 60 08 06.

email: yannick.goumon@inserm.u-strasbg.fr

Diferenciación sexual: el factor de Jost

Ana M.^a Pascual-Leone Pascual*

* Académica de Número y Vicepresidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Conferencia impartida el 16 de abril de 2009.

RESUMEN

El estudio de la diferenciación sexual de los mamíferos es, sin duda, un ejemplo relevante de proceso epigénético producido por la interacción entre genoma y hormonas secretadas por los testículos fetales: la testosterona y la hormona anti-Müllerian.

La diferenciación sexual se produce a nivel periférico, en las gónadas y, también, a nivel cerebral, hipotálamico, en dos vertientes: la neuroendocrina y la de conducta sexual. Ambas vertientes del dimorfismo sexual cerebral pueden ser estudiadas en rata. La primera, por la ovulación, o no, que se produce en un ovario trasplantado en la cavidad abdominal de ratas hembras o en machos, los cuales son, ambos, castrados, previamente al nacimiento, y, la segunda, por la postura de *lordosis*, que presentan las ratas hembras, debidamente diferenciadas sexualmente, frente al macho. Se han localizado las diferentes zonas cerebrales en donde existen receptores para estrógenos.

En la diferenciación periférica o gonadal el diferenciador es el testículo fetal que secreta dos hormonas. La testosterona que mantiene y diferencia los canales Wolff en vasos deferentes, epidídimo y vesículas seminales y la hormona anti-Müllerian (AMH) que provoca la regresión de los canales de Müller, todo ello, en el embrión genéticamente macho. En el cual se diferencian, previamente, los testícu-

los en la etapa fetal de desarrollo de gónadas. En el embrión hembra, sin testículos, y consecuentemente sin testosterona ni AMH, los canales de Wolff involucionan y los de Müller, de forma espontánea, se diferencian en útero, tronpas de Falopio y parte superior de la vagina.

El conocimiento y aclaración de dichas cuestiones pudo establecerse por el descubrimiento, en fetos de conejos, hecho por el Profesor Alfred Jost, en París (1947-50), de la hormona anti-Müllerian (AMH).

Actualmente, la AMH se presenta con múltiples funciones, aunque la más fundamental sea la de regresión de los canales Müllerian en los fetos genéticamente masculinos. Esta hormona es, además, un marcador de patologías como las neoplasias ováricas o la anormal esteroidogénesis del ovario y su hallazgo aclara todo el heterogéneo grupo de patologías de intersexualidad gonadal.

Se ha clonado su gen y se han preparado sus anticuerpos. Por pertenecer a la familia del TGF β (factor de crecimiento transformante β) cuyos miembros están implicados en procesos neoplásicos está siendo, actualmente, muy estudiada. Tanto sus posibles aplicaciones en terapéutica, como sus funciones en adulto, son aún investigaciones abiertas al futuro.

Palabras clave: Genes; Testículos; Canales Wolff y Müller; Testosterona; Hipotálamo; Hormona anti-Müllerian (AMH).

ABSTRACT

Sexual differentiation: the Jost factor

Sexual differentiation in mammals is a good example of the epigenetic process produced by the interaction between the genome and hormones secreted by the fetal testes: testosterone and anti-Müllerian hormone (AMH).

Sexual differentiation takes place in the gonads and brain (hypothalamus) in two branches: neuroendocrine and sexual behavior. Both branches of the cerebral sexual dimorphism can be studied in the rat. The former by the ovulation pattern of an ovary

transplanted in the abdominal cavity of male or female rats which are castrated at birth. The latter can be examined by the response of *lordosis* of female rats with plain sexual differentiation in front of the male. The different brain regions containing estrogen receptors have been localized.

Fetal testes regulate gonadal differentiation through two hormones; testosterone an anti-Müllerian hormone. Testosterone differentiates Wolff channels in deferent vessels, epididimus and seminal vesicles, and AMH induces the regression of Müller channels in the genetically male embryo, in which testes are previously differentiated in the last fetal stage of gonad development. In the female, with no testosterone or AMH, the Wolff channels undergo involution and those of Müller spontaneously differentiate to uterus, Fallopian trumps and upper part of vagina.

The credit for the knowledge of these matters should be given to Prof. Alfred Jost (Paris, 1947-50), who discovered AMH in rabbit fetuses. Currently, AMH has been endowed with many biological functions, the most important being the involution of Müllerian channels in genetically male fetuses. AMH is a biomarker of diseases such as ovarian tumors and abnormal steroid synthesis in ovary and its finding helped explain a heterogeneous number of sexual-related pathologies.

AMH gene has been cloned and anti-AMH monoclonal antibodies obtained. Since AMH has been associated with the transforming-growth factor beta (TGF- β) family, whose members are involved in cancer processes, its biological functions and potential therapeutic applications are currently and will certainly be subject of intense studies.

Key words: Genes; Testes; Wolff and Müller ducts; Testosterone; Hypothalamus; Anti-Müllerian hormone (AMH).

1. PALABRAS PREVIAS

Actualmente, está completamente establecida la interacción, durante el desarrollo de los mamíferos, entre factores ambientales y genoma para la proliferación celular y diferenciación de órganos

que, finalmente, darán lugar a un organismo adulto. Es decir, está establecido que, durante el desarrollo tiene lugar una *programación ambiental génica* de la cual, además, va a depender la futura salud y enfermedad del organismo adulto (1, 2).

En esta programación tienen un papel primordial los nutrientes porque no solamente son el sustrato energético necesario en etapas de crecimiento, sino que, como hemos expuesto en otras ocasiones en esta Corporación (3-5), los nutrientes modulan la secreción de hormonas genéticamente establecidas para regular el crecimiento.

Pero hoy vamos a exponer cómo, entre estos factores ambientales decisivos en dicha programación, las hormonas ocupan, igualmente, un lugar muy importante y, quizá, uno de los ejemplos más claros de ello sea la diferenciación sexual de la cual vamos a hablar.

Uno de los investigadores que más han contribuido a la comprensión de la diferenciación sexual en los mamíferos y que, además, es reputado en todo el mundo científico como uno de los investigadores pioneros de la endocrinología fetal fue Alfred Jost. El cual hasta el final de su vida, murió en febrero 1991, y ocupando los laboratorios de Monod, del Premio Nobel en el Colegio de Francia, estuvo dedicado, fundamentalmente, a la diferenciación sexual, ya que había descubierto, ya en 1947 (6), una hormona, la *hormone inhibitrice*, tal como él la llamó, en su primera publicación, al factor del cual vamos a hablar en la segunda parte de la exposición y que hemos denominado *factor de Jost*.

2. DIFERENCIACIÓN SEXUAL

En la diferenciación sexual de los mamíferos hay que distinguir:

- a) Diferenciación periférica o gonadal.
- b) Diferenciación cerebral: neuroendocrina y de conducta sexual.

a) Diferenciación sexual periférica o gonadal

No se pretende hacer una exposición exhaustiva de la diferenciación sexual, sino describir sus etapas más relevantes para poder

destacar, posteriormente, en la segunda parte de esta exposición, la importancia que tiene el descubrimiento del factor de Jost. Por otra parte, vamos a tratar de exponer, en esta primera parte, los conocimientos científicos actuales de la diferenciación sexual para aclarar y explicar, científicamente, las preguntas que surgen, y que han sido planteadas en esta Corporación en distintos Seminarios, acerca de las bases científicas que explican la existencia de individuos en los cuales su sexo legal, establecido en su nacimiento, no coincide, en ocasiones, con la identidad sexual vivida por su organismo.

Desde tiempo, se conocen las distintas etapas de la diferenciación sexual en lo referente a diferenciación de gónadas, que podríamos llamar diferenciación periférica y también se conoce el papel esencial en la diferenciación sexual masculina, de la testosterona fetal; tanto a nivel periférico, en diferenciación de genitales, como a nivel central en el cerebro modulando allí secreciones neuroendocrinas y conducta sexual (7, 8).

Los genes situados tanto en el cromosoma X como en el cromosoma Y e incluso en los autosomas, genes no sexuales, deben estar en situación funcional para que comience la diferenciación sexual en ambos sexos. La diferenciación sexual que hemos llamado periférica comprende cuatro etapas principales: *a)* la determinación del sexo genético, *b)* la formación de estructuras sexuales indiferenciadas, *c)* el desarrollo de sexo gonádico y, finalmente, *d)* el desarrollo del fenotipo sexual.

1. *Establecimiento del sexo genético*

Actualmente, el establecimiento del sexo genético, y todas las etapas de la fecundación de un ovocito, son muy conocidas por los estudios citológicos realizados en las fecundaciones *in vitro*.

El sexo genético es determinado en el momento de la fecundación por la unión de dos células haploides: el ovocito, que contiene, en humano, 23 cromosomas, entre los cuales está el cromosoma X y un espermatozoide que podrá ser, o bien 23 X o 23 Y. En la fecundación de un ovocito, de forma normal, se suelen distinguir unas siete etapas. A partir de la quinta se ha formado primero un pronúcleo proveniente del ovocito y, posteriormente, otro proveniente de la cabeza del

espermatozoide. Ambos pronúcleos se fusionan luego para formar un óvulo fecundado 46 XX o 46 XY en una fecundación normal.

2. *Formación de estructuras indiferenciadas en ambos sexos y posterior desarrollo del sexo gonádico*

Ambas etapas, enunciadas en este apartado, la formación de estructuras indiferenciadas y la diferenciación de órganos sexuales, van encaminadas, en los organismos femenino y masculino, a la conformación de los genitales. Sin embargo, en ambos sexos, aunque tengan diferente dotación genética, adquirida en la fecundación, comienzan por aparecer las mismas estructuras absolutamente indiferenciadas en hembra y macho. Estas estructuras indiferenciadas, que surgen, en humano, aproximadamente, en la tercera semana de gestación, son, en primer lugar, células germinales primitivas localizadas en las paredes del saco vitelino, al nivel de unión con el alantoides. El estudio de estas estructuras indiferenciadas, su orden de aparición y sus funciones, corresponden a la etapa embrionaria del desarrollo. En humano, a partir de la sexta semana de gestación las células germinales, en ambos sexos, migran a lo largo del alantoides, a través del mesenterio dorsal, para llegar a las llamadas crestas genitales. Finalmente, en el comienzo de la sexta semana de la vida embrionaria, los embriones, sean de sexo genético femeninos o masculinos, tienen los dos un par de canales internos los canales de Wolff y de Müller.

Los canales de Wolff toman nacimiento partiendo del sistema excretor tubular del riñón.

Los canales de Müller se desarrollan a partir del epitelio celómico, cerca de las crestas genitales, y son más exteriores que los de Wolff (Figura 1). No entran en contacto con las gónadas, sino que se unen en su extremo distal para, finalmente, formar, en la diferenciación femenina, el canal útero-vaginal (7).

Ambos canales, Wolff y Müller, son básicos para pasar a la fase siguiente de la diferenciación sexual, o sea, al desarrollo del sexo gonádico, porque en esta etapa los canales de Müller formarán, en las hembras, el conjunto de útero, trompas de Falopio y parte superior de la vagina, mientras que los de Wolff se diferenciarán en vasos deferentes, epidídimo y vesículas seminales en los machos (9).

Ambos canales son conocidos desde hace mucho. La primera descripción de lo que posteriormente se ha conocido como canales de Müller se debe al anatomista alemán J. Müller (1801-58), y los de Wolff a otro alemán, Caspar F. Wolff (1733-94) (9).



Figura 1. Conjunto urogenital agonal de estructuras indiferenciadas sexualmente que desarrollan tanto los embriones genéticamente masculinos como los genéticamente femeninos. Figura modificada de cita (9).

3. Desarrollo del sexo gonádico

Una etapa muy importante de la diferenciación sexual es la transformación de la gónada indiferenciada en testículos en los embriones machos. Para dicha transformación es absolutamente necesaria la presencia del cromosoma Y. Esta transformación se produce, sin embargo, también, en presencia de más de un cromosoma X como en el síndrome de Klinefelter (cariotipo 47 XXY) o también se produce en la presencia de más de un cromosoma Y, como en el síndrome 47 XYY. Por consiguiente, anomalías en el cromosoma Y pueden ser fundamentales para la formación anómala de los testículos, dando fenotipos feminoides con alteraciones gonádicas. Se piensa que el gen del cromosoma Y, responsable de la diferenciación testicular

está situado en el brazo corto de dicho cromosoma. La proteína específica se llamó primero «determinante específico del cromosoma Y»/Td-Y) y actualmente al gen sobre la región del cromosoma Y que determina el sexo llamado SRY (*sex determining region*). En el cromosoma Y existe también un gen que expresa un factor de histocompatibilidad (H-Y) por el cual un macho admite injertos de piel femeninos, cosa que no ocurre en las hembras ante los injertos masculinos. Pero, finalmente, se cree que las proteínas Td-Y y H-Y se expresan por genes distintos en el cromosoma Y. Hay que hacer notar que en el hombre, por estudio de alteraciones gonadales, se conoce que en el desarrollo testicular de la diferenciación masculina hay un gen sobre el cromosoma X cuya existencia es necesaria para un desarrollo adecuado de los testículos. En este desarrollo cooperan, sin duda, también, expresión de genes autosomales.

A la séptima semana de la gestación, los cordones sexuales del testículo pierden su relación con la superficie celómica, y la parte epitelial de los cordones se desarrolla formando el complejo celular de los tubos seminíferos y las células de Sertoli adyacentes, mientras el tejido mesenquimatoso situado entre los tubos seminíferos dará lugar a las células de Leydig, responsables de la producción de esteroides, fundamentalmente testosterona (7, 9).

4. *Diferenciación del sexo fenotípico*

La próxima etapa de diferenciación sexual, la fenotípica, está dirigida a la formación de los canales sexuales internos y la diferenciación de los órganos de los genitales externos. Y ambas cosas, en la diferenciación sexual masculina, necesitan de la presencia de la testosterona producida en los testículos fetales por las células de Leydig. Sin dicha testosterona no se produce, en los embriones masculinos, la transformación de los canales de Wolff, en epididimo, vasos deferentes y vesículas seminales. Los canales de Wolff, en los embriones machos, involucionan o se desarrollan mal, o parcialmente, dependiendo de la cantidad de testosterona secretada por su testículo fetal. Por la misma causa, en la diferenciación femenina, cuyos embriones no secretan testosterona porque no tienen testículos (10) el canal de Wolff involuciona.

Pero, además, en los embriones femeninos, los canales de Müller, de forma espontánea, en la ausencia de testosterona, se diferencian en útero, tubos de Falopio y parte superior de la vagina mientras, en los embriones masculinos, con testículos y testosterona, involucre el canal de Müller. Y es ese dimorfismo de diferenciación sexual que se produce entre los embriones femenino y masculino, a pesar de que parten ambos de estructuras similares en el estadio de gónadas indiferenciadas, lo que queremos destacar.

Durante años no se tuvo claro cuál era la secreción, ni el proceso, por el cual el canal de Müller involucre en los embriones masculinos, ya que la presencia de testosterona, que es necesaria para la transformación y evolución del canal de Wolff, no parecía, de forma clara, ser el motor por el cual en estos embriones involucre el canal de Müller. Y es, precisamente, en este punto cuando los experimentos del Profesor Jost, en París, vinieron a aclararlo, con el descubrimiento de una hormona, el factor de Jost del que vamos a hablar en la segunda parte de esta exposición.

Es decir, el descubrimiento de Jost vino a aclarar el proceso y las secreciones testiculares que rigen la diferenciación sexual masculina en la etapa fenotípica y, como veremos, como consecuencia, el porqué y el modo de cómo se podían producir las patologías, descritas por la clínica, de anomalías morfológicas en genitales masculinos. Pero, además, sus descubrimientos abrieron el campo a investigaciones todavía en curso.

b) Diferenciación sexual cerebral: neuroendocrina y de conducta

Desde muy antiguo se sabe que animales castrados alteran sus manifestaciones sexuales en dos niveles: el de secreciones neuroendocrinas y el de conducta, los cuales requieren, ambos, un control cerebral. Como relata Bruce S. McEwen en 1976 (11), ya en 1849, Arnold A. Berthold de la Universidad de Göttingen encontró que gallos castrados dejaban de tener conducta de machos en la pelea, o frente a una hembra, y que si trasplantaban testículos en su cavidad abdominal, la conducta de macho reaparecía. Como no había hecho ninguna conexión nerviosa, dedujo que, por vía sanguínea, sustancias que secretaba el testículo viajaban por la sangre y llegaban al cerebro.

En 1936, Pfeiffer publicó un trabajo en el cual se exponía que si a una rata hembra recién nacida se le trasplantaba un testículo o se le ponían inyecciones de andrógenos los primeros días de vida, se producía más tarde una permanente anovulación (12). Sin embargo, aunque el verdadero desarrollo de estos trabajos se produjo a finales de los años sesenta, comenzó su interés a partir del setenta (13).

Hoy, sabemos que la testosterona, desdoblada en las propias neuronas en dihidrotestosterona y estradiol (Figura 2) por acción enzimática, es la que directamente influencia la diferenciación sexual del cerebro. En las neuronas existen receptores nucleares del estradiol, de igual estructura que en los de tejidos periféricos, y es el estradiol, proveniente de la testosterona, el que uniéndose a sus receptores neuronales incide sobre los circuitos nerviosos configurándolos en el cerebro inmaduro y de forma irreversible en la edad adulta. En el cerebro adulto el papel de las hormonas sexuales se limita a influenciar la eficacia funcional de los circuitos neuronales que dichas hormonas crearon durante el desarrollo (14, 15).



Figura 2. Acciones de la testoteron secreta por el testículo fetal y de sus metabolitos estradiol, dehidrotestosterona y β -androstanos, en distintos lugares durante la diferenciación sexual fetal en los embriones genéticamente masculinos.

La configuración de los circuitos neuronales, por las hormonas sexuales en etapas inmaduras, concretamente por el estradiol, proveniente de la testosterona, en los embriones machos en desarrollo, tiene consecuencias en dos vertientes regidas por el cerebro. Una neuroendocrina, en este caso, producida por la hormona hipotalámica del axis gonadal LRH que rige y estimula las secreciones gonadales en la hipófisis, y otra, igualmente regida por el cerebro, la de la conducta sexual. Las secreciones de la hipófisis en el axis gonadal, concretamente la LH (hormona luteotropa) se secreta, en los mamíferos, de forma distinta en machos que en hembras. La secreción de la hormona luteinizante hipofisaria LH en las hembras es cíclica, y por ello se produce la ovulación mensual y el aumento en los ovarios de la secreción de estradiol, mientras en los machos la LH se secreta de forma tónica para estimular en los testículos la secreción de testosterona. La otra secreción hipofisaria gonadal, la FSH, hormona estimulante del folículo, produce la maduración del folículo ovárico en las hembras y estimula la espermatogénesis en los machos.

En la rata hembra ambas vertientes, la neuroendocrina y la de conducta sexual, pueden ser observadas y valoradas por un observador externo. La neuroendocrina por la capacidad de estimular la ovulación de un ovario trasplantado, en dicha rata hembra previamente ovariectomizada, puede ser una prueba observable de tener un hipotálamo feminizado, por tanto, capaz de estimular en la pituitaria la secreción cíclica de LH. Y la conducta sexual de hembra se manifiesta, frente al macho, por una postura especial llamada de *lordosis*.

Un trabajo muy esclarecedor de todo ello fue el realizado por Gorski en 1965 (16). En él mide el índice de feminización del hipotálamo por la capacidad de ovulación que se manifiesta en ovarios trasplantados en la cavidad abdominal tanto en ratas hembras como en machos. Este investigador castraba, previamente, los animales machos el primer día de su vida e inyectaba testosterona o estradiol a las hembras recién nacidas. Así comprobó que las hembras que recibían testosterona o estradiol los tres primeros días de vida, tuvieran o no sus ovarios intactos, no eran capaces de producir ovulación en el ovario trasplantado como sucede con un macho normal, porque esas hembras, como los machos normales, habían masculinizado su hipotálamo por la llegada al cerebro de la testosterona o estradiol.

Por el contrario, el ovario trasplantado ovulaba en machos castrados el primer día de vida como ocurre con una hembra normal, porque ese macho al no recibir testosterona en el momento de su desarrollo cerebral, tenía un hipotálamo feminizado como una hembra y, por tanto, era capaz de producir en su hipófisis la secreción cíclica de LH. De estas experiencias parece deducirse, como se ha comprobado posteriormente, que los hipotálamos nacen potencialmente femeninos y es la llegada de la testosterona, en etapas de inmadurez, la que los masculiniza (Figura 3).

Hemos dicho que en periodo adulto, en todas las especies, las hormonas sexuales solamente refuerzan los circuitos neuronales establecidos en etapas inmaduras y de forma transitoria. Por ello, en cuanto a conducta, un macho castrado el primer día de vida, se comporta, en periodo adulto, como una hembra normal, es decir, refuerza levemente su conducta masculina, por razón y acción de la testosterona que recibe, y, grandemente, la conducta de hembra por acción del estradiol, mostrando postura de lordosis frente a otro macho. Y, de igual forma, una hembra que recibe testosterona los primeros días de vida, se comporta como un macho normal, o sea refuerza su conducta de macho en periodo adulto cuando recibe testosterona, y, sin embargo, levemente la conducta de hembra cuando, en etapa adulta, recibe estradiol y no muestra la postura de lordosis frente al macho. Lo cual, concuerda totalmente con las conclusiones y efectos obtenidos, en vertiente neuroendocrina, observado en las experiencias de ovarios trasplantados expuestas anteriormente (Figura 3). En el trabajo de Gorski, en 1965, se planteaba la cuestión de porqué las inyecciones de estradiol, hormona femenina, masculinizan a las hembras igual que las de testosterona y, por otra parte, la cuestión de que si el estradiol masculiniza, cómo se protegen los fetos hembra de sus estrógenos o los de su madre.

Hoy parece que dichas preguntas están contestadas, ya que lo que masculiniza el hipotálamo es el estradiol que proviene del desdoblamiento de la testosterona en estradiol y dihidrotestosterona (Figura 2) y además, se conoce la existencia de una α -fetoproteína que parece fijar en los fetos hembra el estradiol (14).



Figura 3. Experimentos de Gorski castrando ratas macho el primer día postnatal o dando testosterona los 3-5 días de vida postnatal a ratas hembra. Y consiguiendo, a nivel cerebral, en etapa adulta, una feminización en el primer caso del macho o masculinización de la hembra tanto en vertiente neuroendocrina como en conducta sexual. Cita bibliográfica (16).

1. *Localización de estrógenos en áreas cerebrales y diferenciación sexual del hipotálamo: importancia del área preóptica*

Los estudios sobre localización de estrógenos o sus receptores en áreas cerebrales tuvieron su máxima eclosión, también, a partir de los años setenta (17). Las dificultades que se encontraron fueron la heterogeneidad del tejido cerebral y la dificultad de localización de receptores de hormonas, pero, afortunadamente, los receptores citoplasmáticos, que se traslocan al núcleo de las hormonas esteroides, se encuentran muy concentrados en regiones específicas y ello facilitó la labor. Se combinaron informaciones recogidas en diferentes vertientes de investigación, por ello, la búsqueda de células sensibles a las hormonas esteroides se mezcló con información recogida implantando las hormonas en distintas regiones específicas del cerebro y, también, recogiendo información eléctrica de la actividad de dichas células nerviosas, antes y después, de la administración de drogas que alteran dicha actividad eléctrica. Con todo ello se formaron cuadros

de circuitos de células nerviosas envueltos en el control de la conducta sexual estudiada en determinados modelos animales.

Se hicieron tres tipos de experimentos: 1) inyecciones de testosterona o estradiol marcados con tritio a animales castrados; 2) trasplantes de testículos u ovarios al mismo tipo de animales, y 3) implante directo de dichas hormonas gonadales marcadas con tritio en ciertas zonas cerebrales (14).

Fue la técnica de autorradiografía la que permitió hacer visibles, bajo el microscopio, las neuronas sensibles a las hormonas esteroides. Ratas, a las que previamente se quitaron los ovarios, se inyectaron, intravenosamente, con estradiol marcado con tritio y, se sacrificaron dos horas después. Posteriormente, se seccionaron sus cerebros y se congelaron. Los distintos cortes cerebrales se pusieron en contacto con una emulsión fotográfica, y se almacenaron por espacio de 3-12 meses. La radiactividad del tritio va impresionando la placa fotográfica y revela, con bastante precisión, dónde ha quedado localizado el estradiol marcado con tritio (17). El estrógeno radiactivo se concentra, específicamente, en la rata, en células del área preóptica, en el hipotálamo y en la amígdala. Estas son áreas del primitivo cerebro «archipallium», el cual se sabe que juega un papel importante en los procesos sexuales de conducta. En estas tres regiones se ha establecido que pueden existir, en cada núcleo aislado celular, de tres mil a cinco mil moléculas de estradiol, mientras en la hipófisis se cuantifican alrededor de doce mil moléculas; cantidad similar a la capacidad del receptor encontrada en las células del útero. También existen diferencias individuales en la capacidad de unión de los receptores en dichas tres zonas cerebrales. Estos estudios, sobre la capacidad de ciertas zonas en el cerebro, para fijar el estradiol, y, por tanto, la localización de los receptores específicos, se han ampliado, siempre con técnicas de autorradiografía, a peces, anfibios o pájaros, encontrándose implicadas, en todos ellos, la mismas zonas cerebrales. Finalmente, se ha hallado que la distribución de receptores estrogénicos en el cerebro del mono, en dichas zonas, es similar a las encontradas en el cerebro de la rata, lo que parece hacer extensiva la localización de estrógenos al cerebro humano (16).

Fueron Naftalin y sus colaboradores (18) los que encontraron, en el cerebro de rata recién nacida, la dotación enzimática para desdo-

blar la testosterona en estradiol y dihidrotestosterona. Zigmond (19) encontró grandes cantidades de tritio, proveniente del estradiol en los núcleos de células aisladas del cerebro de ratas hembras a las cuales previamente se les había dado estradiol marcado con tritio. Y Lieberburg encontró en el área preóptica de rata recién nacida, a la que, previamente, había inyectado testosterona marcada con tritio, estradiol tritiado (18). Es, pues, el estradiol que proviene de la testosterona el que masculiniza el hipotálamo y lo hace en doble vertiente, neuroendocrina y en cuanto a conducta sexual.

2. *Modulación de neuronas cerebrales por las hormonas gonadales y conclusiones*

Resumiendo, podemos decir que el hipotálamo nace potencialmente femenino, en ambos sexos, y es la llegada de la testosterona proveniente de los testículos fetales, secretada por sus células de Leydig, en los embriones genéticamente machos, lo que lo masculinizan. Todo ello en épocas de inmadurez del Sistema Nervioso Central, permaneciendo de forma irreversible en etapa adulta dicha masculinización.

Consecuentemente a ello, en los embriones de la rata, genéticamente hembras, pero que reciben dosis de testosterona o de estradiol los primeros días de su vida, la diferenciación sexual se produce por modificación neuroendocrina, la cual masculiniza el hipotálamo. Entonces se conforma el hipotálamo, en la secreción de su hormona LRH, para la desaparición de la secreción cíclica de LH (*hormona luteotrópica*) en pituitaria y, por tanto, en dichas hembras, existirá luego una anovulación permanente en etapa adulta (Figura 3). Pero, además, en la vertiente de la conducta sexual, en estas ratas hembras adultas, desaparece la postura de lordosis frente al macho.

Hoy conocemos que las células alrededor del núcleo ventromedial del hipotálamo facilitan en la rata hembra la postura de lordosis y, también, que lesiones en estas células conducen a la pérdida de dicha postura. Así, pues, las células del hipotálamo integran en el organismo las respuestas de conducta sexual con los aspectos neuroendocrinos, lo cual se establece en la diferenciación sexual perinatal (14, 16), pero perdura en periodo adulto.

En los animales adultos, uno de los más importantes efectos de las hormonas gonadales es reforzar la conducta sexual, de forma transitoria. Se ha visto que en las ratas hembras que habían sido castradas el aumento de la receptividad frente al macho, y por tanto la adopción de la postura de lordosis, después de una inyección de estradiol, se produce al cabo de veinte horas. Este retraso es independiente de la dosis de estradiol inyectada y es similar al tiempo que transcurre entre el ciclo del estro y el incremento de la secreción de estradiol por los ovarios. Este lapso de tiempo entre la inyección y los resultados en la conducta, en la rata hembra adulta, ha permitido estudiar los acontecimientos intracelulares. Se ha mostrado que en las doce primeras horas, después de la inyección de la hormona, los receptores en el núcleo celular de las zonas del cerebro, hipotálamo, área preóptica y amígdala, son ocupados por la hormona. Como los efectos sobre la conducta tardan veinte horas, todo parece indicar que la inyección de estradiol inicia cambios metabólicos dentro de las neuronas diana que son responsables de la posterior conducta de los animales. Esto hizo pensar que síntesis de RNA y de proteínas debía producirse en el proceso, de modo similar a como se sabe que actúan las hormonas esteroides en otros órganos diana periféricos, como el útero o el oviducto de gallina. Es decir, incidiendo, una vez unidos a sus receptores e introducidos en el núcleo celular, en el ADN (ácido desoxirribonucleico), y modificando posteriormente la síntesis del ARN (ácido ribonucleico) con el consiguiente cambio en la síntesis de proteínas que luego serán responsables de la respuesta a la hormona. Para ello se hicieron experiencias infundiendo en el área preóptica actinomicina D, que es un inhibidor de la síntesis de ARN, o cicloheximida, inhibidor de la síntesis proteica, y se observó que, en ambos casos, se bloqueaba la acción del estradiol sobre la conducta sexual, impidiendo que las ratas adoptaran la postura de lordosis frente al macho a pesar de haber recibido estradiol (20). Se puede concluir que la acción de los estrógenos sobre la conducta reproductora o sexual desencadena una secuencia de acontecimientos que comienzan con la entrada de estrógenos en el cerebro y su acumulación en receptores específicos en determinadas áreas ya conocidas. Todo ello modula la actividad de la célula nerviosa y su respuesta.

2.1. Investigaciones actuales sobre dimorfismo sexual cerebral. Reflexiones

Los estudios de dimorfismo sexual a nivel cerebral comenzaron a finales de los años setenta, fundamentalmente, por Gorski y colaboradores (21), los cuales encontraron que núcleos del área preóptica del hipotálamo que llamaron SDN-POA (*sexually dimorphic nucleus of the preoptic area*) examinados con técnicas de tinción, presentaban un volumen mayor en machos que en hembras. Y, posteriormente, mostraron que el mayor volumen era debido a que tenían mayor número de células (22).

Sin embargo, la era moderna de estudios sobre la diferenciación sexual en el cerebro se inauguró en 1971 cuando Raisman y Field identificaron la primera clara diferencia sexual en la conectividad neuronal utilizando el microscopio electrónico (23). Aunque anteriormente se creía que modos estereotípicos de conducta sexual eran dependientes de la organización de conexiones neuronales, los encuentros de dichos autores, acerca de que los modelos sexualmente diversos de sinapsis podían ser revertidos por tratamiento con testosterona, fueron la primera evidencia de que el papel de las hormonas esteroideas sobre la conducta podía tener una base estructural. Y esta hipótesis se confirmó, más tarde, por Gorski y colegas (21, 22), cuando mostraron que las acciones de las hormonas sexuales no se limitan, en periodos de desarrollo, a sutiles alteraciones en la organización sináptica, sino a dimorfismo en el tamaño de las células en el área preóptica media.

Todas estas investigaciones han llevado a establecer una cuestión básica y rectora de la diferenciación sexual y es que el cerebro nace bipotencial, cualquiera que sea la dotación genética del embrión, pero se desarrolla de forma diferente en machos y en hembras durante el periodo perinatal bajo la influencia de hormonas esteroideas sexuales. En la rata macho, la secreción de andrógenos desde los testículos fetales diferenciados presenta dos elevaciones en plasma de testosterona, la primera ocurre en el día dieciocho de gestación, y la segunda aproximadamente dos horas después del nacimiento (24). Hoy se puede afirmar que es el ambiente de hormonas sexuales, la testosterona o mejor sus metabolitos dihidrotestosterona y estradiol, durante el periodo perinatal, lo que causa en el cerebro un cambio en su estructura y función sexual. El ambiente perinatal esteroideo determi-

na, interactuando con el cerebro en desarrollo, conducta reproductora masculina o femenina a la vez que determina que la hipófisis no tenga en machos y sí en hembras un aumento cíclico, preovulatorio, de gonadotropinas. Es decir, no secreción cíclica en machos y sí en hembras de LH. Secreción de LH pituitaria que, en el axis gonadal, está estimulada por la hormona hipotalámica LRH (*luteotropin-releasing hormone*) secretada en el núcleo arcuato (25).

Actualmente se están estudiando en los mamíferos, un gran número de dimorfismo morfológicos y neuroquímicos cerebrales en diversas especies (26, 27).

En modelos animales se ha mostrado que el estradiol modula el funcionamiento de casi todos los sistemas de neurotransmisores como el serotoninérgico, dopaminérgico, adrenérgico y colinérgico (28-30). Además de actividad límbica diferencial y tiene una gran influencia sobre el funcionamiento del axis hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) (*hypothalamus-pituitary-adrenal*) (30, 31).

También se ha mostrado la existencia de dos receptores para el estradiol el alfa y el beta ($ER\alpha$ y $ER\beta$) ambos están abundantemente expresados en el sistema límbico y en áreas cerebrales como amígdala, hipotálamo, stria terminalis, área preóptica y córtex prefrontal y su distribución puede variar entre estas regiones, lo que puede explicar los diferentes efectos del estrógeno en el cerebro (32, 33).

Las principales diferencias sexuales estructurales entre los cerebros masculinos y femeninos se han encontrado, los últimos años, en el núcleo hipotalámico medio preóptico (MPN) y en el núcleo periventricular anteroventral (AVPV) del hipotálamo, los cuales están conectados con las rutas sensoriales límbico-hipotalámicas que modulan la conducta reproductora y, algunas de ellas, entre sistema límbico e hipotálamo, permiten que, en la conducta sexual, intervengan impresiones olfativas, cuyas conexiones al hipotálamo están más desarrolladas en los organismos masculinos (34). En el núcleo hipotalámico medio preóptico (MPN) el número de células es más grande en los machos, contrariamente a lo que ocurre en el núcleo AVPV. Núcleo, este último, muy secretor y cuyo número de células parece ser más grande en los organismos femeninos. Gorski y colaboradores han estudiado el mecanismo por el cual la testosterona, en etapas inmaduras, provoca estas diferencias en el número de células de

determinados núcleos hipotalámicos, llegando a la conclusión que actúa inhibiendo la apoptosis o muerte celular programada (35).

El hipotálamo juega un papel crítico en coordinar la expresión de la conducta reproductiva integrando respuestas fisiológicas y sugerencias ambientales. La relación fisiológica y anatómica con la glándula hipófisis es un medio efectivo para coordinar procesos homeostáticos a través de la regulación neuroendocrina de secreciones hormonales. Pero el hipotálamo también tiene conexiones fuertes con la región límbica, hipocampo y amígdala, por ello puede coordinar respuestas neuroendocrinas con sugerencias sensoriales que regulan las motivaciones de la conducta sexual.

Actualmente la región más estudiada ha sido el área preóptica, y se comienzan a conocer las pautas que siguen estas coordinaciones hipotalámicas, pero indudablemente estamos aún al comienzo de conocer todos estos dimorfismos sexuales cerebrales, que en el futuro redundaran, sin duda, en una mejor comprensión de dimorfismos psicológicos y diferencias de conducta en ambos sexos.

Hasta épocas muy recientes no se ha tenido conciencia, ni ha interesado a los investigadores básicos, en investigaciones preclínicas, estudiar el dimorfismo sexual cerebral, pero actualmente por el estudio de dicho dimorfismo ante situaciones de estrés, parece claro que ello será muy necesario en el futuro para tratar depresiones, ya que muchas veces se aplican terapéuticas estudiadas y estandarizadas para cerebros masculinos v/a, organismos femeninos, los cuales responden al estrés por mecanismos diferentes (30).

Esta estructuración neuronal que se realiza en el cerebro, a través de las hormonas esteroides durante el periodo fetal y de forma irreversible para el adulto, es la que permite al hipotálamo poder integrar información del ambiente externo con sugerencias internas que reflejen el estado fisiológico de los organismos. Y ello es imprescindible para elaborar respuestas adaptativas neuroendocrinas y de conducta para la supervivencia de los organismos. Pero dicha coordinación cerebral hipotalámica es absolutamente imprescindible para los procesos reproductivos. Para la propagación de la especie la conducta sexual deberá producirse en situación fisiológica adecuada en los organismos de ambos sexos. En situación neuroendocrina propicia en ambos sexos. Deberá producirse la conducta sexual paralelamente a

las secreciones neuroendocrinas de la hormona hipotalámica gonadal LRH (*luteotropin-releasing hormone*), que es la que estimula en hipófisis la secreción cíclica en hembras y tónica en machos de la luteotropina o LH, que rige la existencia de la menstruación y aumenta estrógenos en ovario para que, finalmente, se produzca la ovulación en las hembras, y en los machos se estimule la secreción de testosterona en las células Leydig del testículo y la espermatogénesis.

Por último, estas investigaciones acerca de la importancia de la interacción, en periodos de inmadurez, entre la testosterona de los testículos fetales y el cerebro, configurando la conducta sexual y secreciones neuroendocrinas, cualquiera que sea la dotación sexual genética de los embriones, son la base científica que explica las anomalías estructurales que pueden producirse cuando dichos procesos diferenciadores se producen mal en etapas fetales. Ello, finalmente, lleva a los organismos a que el sexo legal, establecido al nacimiento, no sea la identidad sexual que siente un organismo en su etapa adulta, porque sus estructuras cerebrales hipotalámicas no se configuraron adecuadamente a la dotación genética sexual que heredaron (Figura 4).

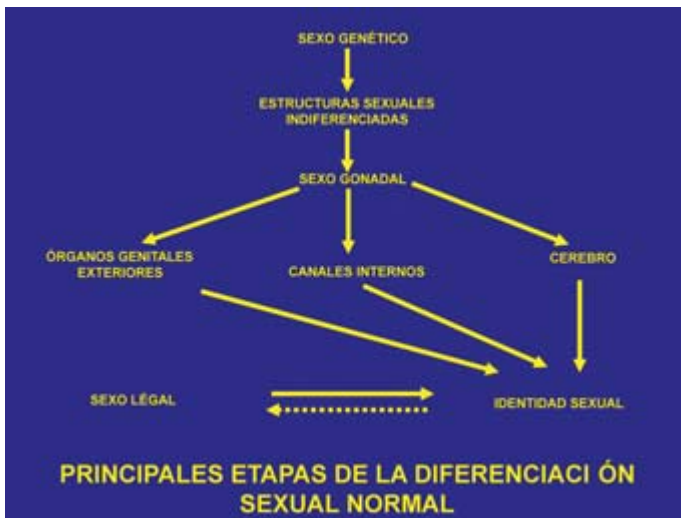


Figura 4. El no cumplimiento de la diferenciación normal de canales internos o de diferenciación cerebral sexual, imposible de detectar por observación al nacimiento, es lo que explica la no coincidencia, en ocasiones, entre el sexo legal establecido al nacer y la identidad sexual sentida por el individuo en periodo adulto. Figura modificada de cita bibliográfica (7).

3. EL FACTOR DE JOST

Cuando hablamos de la etapa de diferenciación del sexo fenotípico, en la cual se produce la diferenciación de los canales internos y de los órganos genitales externos, ya anunciamos que las investigaciones del Profesor Jost en París, a partir de los años 1947-50 (6, 36) habían venido a aclarar muchas cuestiones en dicha etapa. Decíamos que los embriones masculinos, para la diferenciación del canal de Wolff en epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales, necesitan la presencia de la testosterona proveniente de los testículos fetales, secretada por sus células de Leydig. Por ello, en los embriones hembra, aunque en su etapa de «gónada indiferenciada» existe como en los embriones masculinos el canal de Müller y el canal de Wolff, el canal de Wolff involuciona por carecer de la presencia de testosterona. Sin embargo, el canal de Müller en embriones femeninos, de forma espontánea, da lugar al útero, tubos de Falopio y parte superior de la vagina. En la ausencia de testosterona, sin embargo, dicho canal involuciona en los embriones masculinos. Siempre se pensó, en el pasado, que la involución del canal de Müller no parecía ser, solamente, una consecuencia de la presencia de testosterona, pero se desconocía la causa rectora de la involución del canal de Müller en la diferenciación fenotípica de los embriones masculinos.

3.1. Experimentos de Jost: su importancia

Las experiencias fundamentales del Profesor Jost sobre dicho tema se pueden resumir en tres grupos y se realizaron en feto de conejo:

1. Comprobó que la castración de fetos masculinos o femeninos, en etapas tempranas de la gestación, tiene como consecuencia la desaparición de los canales de Wolff en ambos sexos, sin embargo, igualmente en ambos, los canales de Müller persisten.
2. Implantó un cristal de testosterona unilateralmente en un feto masculino, previamente castrado, y observó que el canal de Wolff del mismo lado se desarrolla pero, además, persistían los canales de Müller de ambos lados.

3. Trasplantó un testículo, en fetos masculinos, previamente castrados, en la cavidad abdominal de un lado, y ello produjo el desarrollo del canal de Wolff y la regresión del canal de Müller del mismo lado del injerto. En el lado opuesto, no injertado con testículo, encontraba una persistencia del canal de Müller mientras podía o no desarrollarse el canal de Wolff de dicho lado no injertado.

Las conclusiones que se desprenden de sus trabajos muestran que el testículo produce un andrógeno, la testosterona, en los fetos masculinos, la cual es imprescindible para el desarrollo de los canales de Wolff y un factor que llamó «hormone inhibitrice» [Müllerian inhibiting factor para los anglosajones (MIF)], que parece ser la causante de la regresión de los canales de Müller en los fetos masculinos. También deduce de sus trabajos que los ovarios, existan o no, no parecen ejercer ningún estímulo, ni regresión, en periodo fetal, ni sobre los canales de Wolff ni de Müller.

Además, estos trabajos muestran que son la testosterona y la MIF los que actúan, respectivamente, sobre el desarrollo de sendos canales Wolff y Müller con una acción local.

En sus publicaciones inglesas (36), Jost llamó a la hormona descubierta «Müllerian inhibitor», pero actualmente es conocida, además de cómo MIF, *inhibiting-substance* (MIS) o con un término más amplio *anti-müllerian hormone* (AMH), como ya se ha mencionado.

Las investigaciones del Profesor Jost han constituido realmente la base de la comprensión del desarrollo del fenotipo masculino. En escritos de 1988 el mismo Jost, sin duda uno de los padres de la endocrinología fetal, nos dice, en transcripción hecha por sus discípulos N. Josso, B. Vigier (37):

«Desde un punto de vista biológico era un desafío que los andrógenos producían una muy parcial masculinización del feto. Ellos, los andrógenos, no duplicaban la condición “freematin” encontrada en el ganado. Era especialmente intrigante que uno no obtiene la desaparición de los canales Müllerian (femeninos) en animales tratados con andrógenos. Yo decidí abordar esta cuestión de un modo no ortodoxo e investigar la actividad endocrina —si había alguna— de las gónadas del feto, utilizando cirugía sobre el feto intraútero. Esto no había sido hecho pre-

viamente, y el primer éxito no fue obtenido hasta duros meses de trabajo, año y medio después. Costó tan largo tiempo no solamente porque en aquel momento era difícil encontrar suficientes conejos para investigar, sino también, porque yo tenía poca experiencia en cirugía refinada. Fue encontrado que cualquiera que fuera el sexo genético de los fetos, el tracto genital se convierte en femenino en la ausencia de gónadas. El testículo fetal es el diferenciador sexual: impone masculinidad contra un programa inherente del cuerpo. Los testículos producen un factor el cual inhibe los conductos müllerian femeninos y los andrógenos que masculinizan el tracto genital. El esquema, el cual explicaba las anomalías sexuales humanas, fue primero publicado en 1950 (Jost, 1950) (36) y más tarde enriquecido por importantes descubrimientos hechos por otros, pero las bases del concepto expuesto permanecen».

La condición «freemartin», encontrada en el ganado, y aludida por Jost anteriormente, fue reportada y descrita por Lillie ya en 1916 (38), en los terneros. Un freemartin es el producto masculinizado del gemelo femenino en una pareja heterosexual de gemelos, los cuales comparten una placenta por anastomosis placentar. El gemelo hembra está masculinizado en conducta y tiene ovarios no funcionales y por tanto es infértil. Este fenómeno fue clasificado durante tiempo como un ejemplo de quimerismo inmunológico y ha sido biológicamente importante para la comprensión de los procesos reproductivos. La hembra de este par de gemelos muestra regresión de los conductos müllerian, está masculinizada externamente y, por supuesto, es infértil. Hoy sabemos que, presumiblemente, ello es debido a los factores solubles producidos por los testículos fetales del gemelo macho que a través de su placenta anastomosada pasan al gemelo femenino. Y ahora conocemos que estos factores son la MIS y la testosterona.

En sus experimentos Jost usó fragmentos de testículos embrionarios que implantó en embriones femeninos de conejo, antes del tiempo de diferenciación sexual de dichos embriones femeninos, y encontró, como en el ternero freemartin, que estos embriones femeninos estaban masculinizados externamente y, por ello, mostraban estimulación en el canal de Wolff para la diferenciación masculina y también, a la vez, regresión en los conductos müllerian. Pero cuando él reemplazó los testículos por pellets de testosterona encontró que el embrión femenino se masculinizaba, aunque no presentaba regresión de los conductos müllerian. Fueron estos experimentos los que le in-

citaron a proponer la existencia de la hormona antimüllerian (AMH) o MIS secretada por los testículos fetales como la testosterona (36).

Estas interesantes conclusiones, y haber descubierto la existencia del MIS secretado por los testículos fetales, le permitieron dar explicación, jamás hasta entonces lograda, a los diferentes fenotipos anómalos encontrados en pacientes con anormalidades intersexuales. Por ejemplo, anormalidades en los genitales externos femeninos por tener hiperplasias adrenales, con producción de excesiva testosterona de origen adrenal, lo cual, sin embargo, no afecta al desarrollo de los conductos müllerian de forma normal, o síndromes de insensibilidad a los andrógenos, lo que provoca, en embriones genéticamente masculinos, feminización testicular. Aunque, a pesar de su feminización, sus testículos continúan produciendo MIS de forma normal, con lo cual existe una buena regresión de los conductos müllerian en dichos pacientes (39).

Jost realizó sus experimentos durante la II Guerra Mundial, y por la escasez de animales de laboratorio, utilizaba conejos salvajes del Bois de Boulogne, esos animales eran muy fuertes, por ello cuando se trataron de repetir los experimentos en conejos blancos de Nueva Zelanda de laboratorio, los abortos, después de la cirugía, eran muy frecuentes y la repetición de sus experimentos difícil. Pero, en 1969 (40) Regine Picon, en el laboratorio de Jost, desarrolló un ensayo de cultivo de órganos *in vitro*, que permite co-cultivar los conductos urogenitales agonadales, no diferenciados, del embrión de rata con testículos fetales, y se pudo comprobar la regresión del canal de Müller en los primeros. El ensayo de Regine Picon, fallecida en septiembre de 2008, fue decisivo para estas investigaciones. En 1972 lo único que realmente se sabía del MIS, u hormona anti-müllerian (AMH), era que se trataba de otra secreción de los testículos fetales diferente a la testosterona, por ello, el ensayo *in vitro* de Regine Picon fue decisivo para progresar en su conocimiento.

3.2. Lugar de secreción de MIS, naturaleza y estructura

El MIS se secreta en las células de Sertoli de los testículos fetales. La primera evidencia de ello se debe a Nathalie Josso (41), discípula de Jost, que separó los tubos seminíferos de las células intersticiales

del testículo fetal y las cultivó, separadamente ambas, *in vitro* junto a los conductos müllerian agonadales, o no diferenciados, de rata fetal de catorce días de gestación. Encontró que solamente los tubos seminíferos producían la regresión de los conductos müllerian, aun en el caso de que tuvieran éstos pocas células germinales (42). También N. Josso encontró que los conductos müllerian de rata fetal agondales, o no diferenciados, respondían al MIS de cualquier especie de animal que se utilizara (37). Y por ello fue elegido el testículo de las vacas para la extracción y purificación del AMH o MIS debido a su gran tamaño. El bovino MIS o AMH es una macromolécula no dializable. Es una glicoproteína. Fue purificada por inmunocromatografía con un anticuerpo monoclonal (43). Actualmente se utilizan técnicas de ADN recombinante para la producción de MIS (37). La hormona anti-müllerian (AMH) también es secretada en las células granulosas del ovario, y se encuentra en los ovarios y en el fluido folicular de muchas especies (9, 10). En contraste a la pauta de secreción generalizada que tiene en las células de Sertoli de los testículos, MIS está claramente localizada en las células granulosas de los folículos preantrales y antrales nunca en otras etapas foliculares, ni en el cuerpo lúteo, y en humano aunque se expresa en ovario a las 32 semanas de gestación, no es valorable antes del nacimiento. En la rata aparece al tercer día postnatal (44, 45). O sea, que en el ovario ambas cosas, la expresión de MIS o su inmunoreactividad, son dependientes del grado de maduración folicular más que de la edad del animal (37). Pero cualquiera que sea el grado de maduración folicular, o la edad del animal, la producción de AMH por las células granulosas es baja comparada con la producción en las células de Sertoli inmaduras del testículo. Sin embargo, medida la actividad anti-müllerian de ambas secreciones, a igualdad de concentración, una vez purificada la hormona procedente de testículos o de ovarios, tienen la misma actividad y el lugar donde se inicia la transcripción es el mismo en ambos tejidos, sugiriendo igual promotor en testículos y ovario (37).

Aparte del ensayo *in vitro* de Picon, ya mencionado, actualmente se mide su producción por inmunocitoquímica y también por un inmunoensayo enzimático llamado ELISA (*enzyme-linked immunoassay*). Se han establecido ya los anticuerpos monoclonal y policlonal de MIS y actualmente se utilizan para análisis de Western

blot, inmunohistoquímica y para el específico y sensitivo ELISA (9). En humano, en los fetos masculinos, la secreción de AMH se encuentra alta en plasma en mitad de la gestación y cerca del nacimiento, pero en fetos femeninos nunca se encuentra. Lo cual muestra su papel masculinizador para la diferenciación sexual en los fetos machos.

Evidentemente, la pauta cronológica de la expresión de AMH es muy importante para una diferenciación sexual normal en embriones masculinos y femeninos. En los primeros *debe estar* presente antes que los conductos müllerian pierdan su capacidad de respuesta a ella y, por tanto, no puedan involucionar, y ello sucede antes de las ocho semanas post-coito en humano, y antes de los quince días post-coito en rata. Por otro lado, en los embriones genéticamente hembras, es necesario que *no esté presente* en periodo fetal, de otra forma los órganos reproductivos femeninos serían destruidos, por involución de los conductos de Müller (46). Establecida esta pauta cronológica, necesaria para la diferenciación sexual normal, en ambos sexos, se puede deducir cómo la existencia de esta hormona ha venido a explicar muchas de las anomalías de diferenciación sexual denunciadas por la clínica.

El MIS maduro experimenta glicosilación y dimerización y se secreta como un dímero de 140 kilodaltons (kDa) de tamaño de dos idénticas subunidades unidas a bisulfitos (10). Una más profunda proteólisis lleva la molécula a los fragmentos, 57 kDa N-terminal y al C-terminal de 12,5 kDa, de los cuales este último es el activo.

Estructuralmente, la hormona anti-müllerian es un miembro de una gran familia multigénica de glicoproteínas envueltas en la regulación del crecimiento y diferenciación celular (47, 48) y, por tanto, una familia sumamente interesante en los estudios de prevención de las neoplasias. Por ello, en los últimos años, está siendo la AMH muy estudiada. Esta familia de glicoproteínas, además de la AMH, comprende: la TGF β (factor de crecimiento transformante β) (49), la inhibina, la activina, el *Xenopus Vg-1*, la *Drosophila decapentaplegia* complex, el factor de la morfogénesis ósea (BMPs) y por último los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs). Todos ellos tienen una homología C-terminal. Y, además, alrededor de siete residuos de cisteína altamente conservados (47). Muchas de estas proteínas son producidas como precursores diméricos, que, para su activación ex-

perimentan procesos similares post-translacionales, los cuales requieren rotura y disociación para secretar C-fragmentos terminales con unión de disulfitos bioactivos (9).

Las AMH o MIS son muy conservadas a través de las especies animales. Son sintetizadas con 553 aminoácidos precursores en la rata y 575 en las vacas. A través de las especies, MIS tiene 11 a 12 cisteínas, de las cuales siete están en el dominio C-terminal. El dominio C-terminal tiene la homología más fuerte entre especies con 108 de los 112 últimos aminoácidos conservados entre vacas y humanos y 104 de los 112 conservados entre rata y humano.

El DNA genómico y complementario de MIS ha sido clonado en humano, bóvidos, rata y ratón (9, 10). Los genes de MIS, a través de las especies, tienen similares estructuras intrón/exón. En bóvidos, humanos y ratas, los genes en las regiones que codifican tienen 65-80% de sus nucleótidos homólogos y de 70-75% de homología en la región del promotor. El gen humano de MIS ha sido situado en el cromosoma 19 y el de ratón en el cromosoma 10 (10).

En contraste con los otros miembros de la familia TGF β , en los cuales el polipéptido activo debe ser obtenido por rotura a partir de grandes moléculas precursores, en la hormona anti-müllerian (AMH), la completa molécula, en toda su longitud, es activa en el cultivo de órganos (37).

El TGF β es un regulador bipotencial del crecimiento celular el cual inhibe el crecimiento normal de células epiteliales normales o malignizadas, sin embargo, estimula la proliferación del tejido conectivo. Por ello sus efectos son más ubícuos y los procesos translacionales más difíciles de seguir mientras en la AMH sus acciones son más dirigidas a estructuras gonadales y por ello está sirviendo su estudio para comprender los procesos moleculares de secreción de esta familia de glicoproteínas tan interesante para establecer estrategias terapéuticas de procesos neoplásicos.

3.3. Control hormonal

El control hormonal de la MIS ha sido estudiado en modelos animales y en sistemas de cultivo de tejidos. Testículos de ratas recién

nacidas, tratados con antisuero de la hormona hipotálamica gonadal LHRH tienen una mayor bioactividad de MIS que los testículos tratados, solamente, con vehículo del ensayo (50), y el tratamiento de los recién nacidos, cinco días después del nacimiento, con hormona pituitaria FSH revertían dicha acción. Sin embargo, la hormona placentaria gonadotropina coriónica (hCG) no tenía efecto (51). Parece que existe un papel en la regulación de MIS a través del axis gonadal (51). Y otros datos confirman la inhibición de MIS por FSH, pareciendo que dicha modulación es mediada por vía transcripcional (52). Por otra parte, la testosterona y hormona placentaria hCG (gonadotropina coriónica) y el LH (luteotropina pituitaria), en contraste con FSH (hormona pituitaria folicular) regulan el MIS post-translacionalmente, ya que aceleran el proceso de rotura de MIS en los fragmentos N y C-terminales (52).

En cultivo de células de Sertoli o de testículos tratados con FSH se encuentra un aumento de AMP (adenosín-monofosfato) cíclico pero, en cultivos, ni la gonadotropina coriónica (hCG) ni el FSH tenían efecto sobre la expresión de mRNA (ácido ribonucleico mensajero) de MIS. No obstante, en cultivo de células granulosas de ovario, fue inducido mRNA de MIS, por AMP cíclico y por gonadotropina coriónica, pero no por FSH, insulina o progesterona (53). Estas experiencias siguen en curso para poder establecer la modulación hormonal de la expresión de mRNA de MIS por dichas hormonas.

En los últimos tiempos otra cuestión que ha llamado la atención científica es la inversa correlación que existe entre los niveles plasmáticos postnatales, en los machos, de testosterona y de MIS, en diferentes etapas postnatales. Ello, intuitivamente, parece indicar una regulación andrógena de la expresión de MIS o bien de los equilibrios de testosterona por MIS o ambos. Sí que hay una regulación de la testosterona por MIS en las células de Leydig y actualmente parece que los bajos niveles de testosterona o alteraciones de los equilibrios de su expresión modifican la expresión de MIS. Sin embargo, hay que decir que en este momento la regulación hormonal de MIS es un mecanismo intrincado que no está establecido a pesar de la mucha investigación realizada al respecto (9). Y dicho conocimiento sería útil para poder restaurar la expresión de MIS en ovarios en edades avanzadas, como terapéutica para la curación de cánceres postmenopáusicos femeninos (9).

3.4. Receptores

El estudio de los mecanismos moleculares implicados en la transducción de señal de MIS ha ido en paralelo, aunque con un progreso más lento al estudio de los de la familia del TGF β (54). La transducción de señales de los miembros de esta familia es un proceso complejo hoy bastante establecido que trataremos de resumir a continuación.

La transducción de señales por los miembros de la familia de TGF β de homodímeros de glicoproteínas ocurre en una secuencia de acontecimientos característica que se inicia con la unión del ligando a un complejo heteromérico de serina/treonina quinasas transmembranares, terminando con la fosforilación del receptor tipo I (también llamado *activin-receptor like kinase*, ALK) por el receptor tipo II. Las rutas de transducción de señales utilizadas por la familia de TGF β presentan dos opciones, una la que utiliza el TGF β y el grupo de tipo activina de receptores tipo I (ALK-1, 4 y 5) y otra la utilizada por el grupo de proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) y factores de crecimiento y diferenciación (GDF) como las ALK-2, 3 y 6. Dentro de la familia, la especificidad viene determinada por el receptor tipo II, que une al ligando cooperativamente con el receptor tipo I en el caso de BMP/GDF, o bien recluta para el complejo al receptor tipo I apropiado en el caso de TGF β /activina. El receptor tipo II activado por el ligando fosforila al receptor tipo I, lo cual, a su vez, activa así su actividad quinasa latente para la consiguiente iniciación de la vía intracelular de las proteínas Smad, que normalmente se translocan al núcleo para activar la expresión génica (55).

Existen tres clases de proteínas Smad, las reguladas por receptores R-Smads (Smads inhibitorias), y la Smad común (Smad 4) (55). Las R-Smads 2 y 3 son fosforiladas por los receptores tipo I TGF β /activin (ALK-4 y 5), mientras que las R-Smads 1, 5 y 8 son fosforiladas por los receptores tipo I BMP/GDF (ALK 2, 3 y 6). Una vez fosforiladas las Smad se dimerizan con la Smad 4 común para formar complejos heteroméricos que se translocan al núcleo y ejercen sus respectivas funciones por su unión al elemento de respuesta a Smad (CAGAC). Bien uniéndose en solitario con una baja especificidad o formando un supercomplejo con cofactores que modulan la expresión génica de forma específica para cada ligando, como ocurre con la proteína ligadora del elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB) (56).

3.4.1. *Receptor de MIS tipo II*

El ARN mensajero del receptor de MIS tipo II fue localizado por primera vez por hibridación *in situ* en el conducto de Müller en el momento en que estaba efectuándose su regresión. Las células de Sertoli en el macho, y las células granulosas en la hembra rodean a las células germinales y producen MIS, la expresión del ligando y el receptor por la misma célula sugiere una actividad autocrina que se da en el periodo fetal en la gónada del macho y, en periodo postnatal en la gónada de ambos. En los testículos perinatales no hay una gran expresión, siendo elevada solamente en el periodo embrionario y postpuberal (57). Dado que el ratón hembra *knock-out* homocigoto del receptor tipo II del MIS presenta una fertilidad y fecundidad normales, parece que el MIS no se requiere para la implantación del blastocisto ni para el desarrollo fetal o embrionario.

Parece que el único factor de transcripción esencial para la expresión del receptor tipo II de MIS es el SF-1 (58). La región del promotor del gen que expresa el receptor tipo II contiene dos sitios de unión del SF-1 que funcionan independientemente. Incluso se ha descrito que la unión simultánea de ligando a ambos sitios SF-1 daría como resultado una inhibición de la expresión.

La eliminación homocigótica de Wnt-7, un miembro de la familia de proteínas Wg/Wnt, que determinan el destino y polaridad celular y la conformación en etapas tempranas, produce la pérdida de la expresión del receptor tipo II de MIS en el conducto Müller (59). Estos ratones, sin dichas proteínas, fueron estériles porque los conductos de Müller, que no han desaparecido, bloquean el paso del espermatozoide en machos y alteran la diferenciación de los oviductos y el útero en hembras.

3.4.2. *Receptor tipo I del MIS*

Aunque se han clonado varios receptores tipo I de la familia TGF β , la identidad del receptor tipo I del MIS está todavía siendo objeto de estudio. La localización del ARN mensajero de ALK2 en el mesénquima que rodea el conducto de Müller embrionario en el momento de su regresión le convierte en un potencial candidato (9). La utilización

de oligonucleótidos antisentido de la secuencia que codifica el ALK2 bloqueó de forma específica la regresión del conducto de Müller (60). También la localización del ARN mensajero de ALK2 con el receptor tipo II del MIS en el mesénquima que rodea el conducto de Müller apoya la identidad de ALK2 como receptor tipo I del MIS (60).

Existen evidencias recientes que indican que Smad 1, 5 y 8 que transducen señales para varios ligandos de BMP/GDF transducen, también, señales para el MIS (60). Es muy probable que las proteínas Smad reguladas por el receptor de MIS formen parte de la ruta BMP/GDF, pero también es posible que la elección de una Smad determinada sea específica de cada tejido o célula. Por todo ello, sería muy interesante conocer la ruta de transducción de la señal del MIS en cada tejido y en distintas situaciones, como desarrollo y tumorigénesis, con el objeto de buscar posibles agentes potenciadores o inhibidores de MIS los cuales tendrían potencial terapéutico.

Como se ve por este resumen, el único receptor de MIS hallado es el II, pero no cabe duda de que el estudio molecular de la transducción de señales de esta hormona aportará un interesante conocimiento a la compleja señalización de esta familia.

3.5. Acciones de la hormona anti-müllerian (AMH) o MIS y su utilidad actual en clínica

La principal acción de AMH o MIS es, por supuesto, la regresión, en los embriones masculinos de los conductos müllerian. En la rata pre-células de Sertoli, en las gónadas indiferenciadas, se concentran alrededor de células germinales y forman cordones seminíferos, en el día 13 postcoito. Por la tarde del 13, y antes de ser detectada la testosterona en las células de Leyding, mRNA de MIS y proteína son detectadas en las inmaduras células de Sertoli (6, 9). Por el día 15 postcoito en la rata, la actividad hialuronidasa aumenta y los constituyentes de la matriz extracelular, tales como fibronectina, empiezan a desaparecer alrededor del mesenquima. Es así como comienza la disolución de los conductos Müllerian (61) (Figura 5).



Figura 5.

Sobre el día 17 postcoito los conductos müllerian han desaparecido y solamente permanecen células mesenquimatosas. Esta cronología en el tiempo de aparición de esta hormona existe, antes o después, según que sean especies más precoces en desarrollo o menos, pero en todas las especies existe un momento de aparición del MIS, que es precisamente el comienzo de la diferenciación sexual en los machos. Por eso se dice que dicha hormona actúa como un marcador biológico de la diferenciación sexual, del mismo modo que tiene un periodo de acción, pasado el cual, no habría regresión de conductos müllerian porque serían insensibles a ella. De aquí una de las causas de las anomalías morfológicas posibles en los embriones masculinos (10).

3.5.1. *Acción sobre actividad «aromatasa», maduración de células germinales y morfogénesis*

De todo lo expuesto se deduce que la AMH está producida exclusivamente por células somáticas gonadales en ambos sexos, sin embargo, existen grandes diferencias de secreción en ellos. Las células inmaduras de Sertoli sintetizan grandes cantidades de AMH que se acumula en el retículo endoplásmico rugoso, en los embriones mas-

culinos y, sin embargo, las células granulosas del ovario sintetizan la hormona de forma medible solamente después del nacimiento en el organismo femenino y siempre en pequeñas cantidades. No obstante se ha observado expresión de MIS en ovarios humanos de 32 semanas de gestación y en rata a los tres días postnatal (9).

Actualmente se han estudiado *in vitro* las acciones que ejerce en el ovario fetal la secreción de AMH. Se ha visto que cuando es añadida en cantidades altas la AMH, por una parte, inhibe el número de células germinales del ovario y, además, histológicamente, van diferenciándose los ovarios, apareciendo estructuras masculinizadas con cierto parecido a células de Sertoli de los testículos masculinos. Por otra parte, se ha medido en los medios de cultivos de ovario, en los que se añade, o no, AMH, la testosterona y el estradiol por radioinmunoensayo, así como la actividad enzimática «aromatasa», la cual es un miembro de la superfamilia del citocromo 450, que transforma la testosterona con 19 carbonos en estradiol con 18 carbonos (Figura 6).

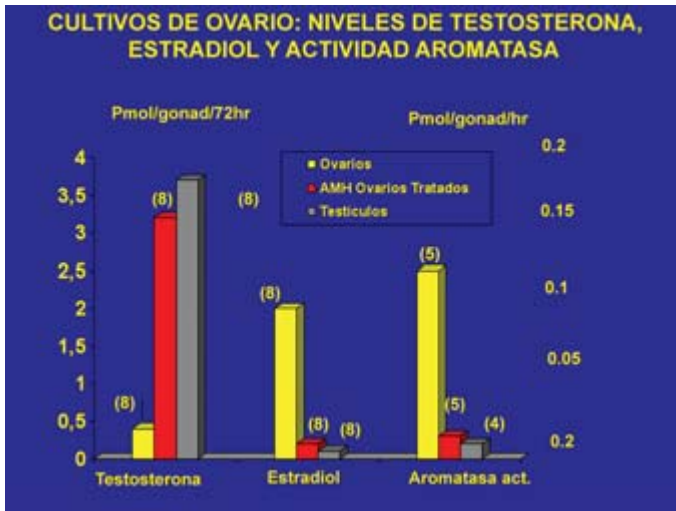


Figura 6. En cultivo de ovarios se mide la testosterona, el estradiol y la actividad enzimática «aromatasa» antes y después de añadir AMH. Se encuentra un paralelismo entre la disminución de dicha actividad enzimática y la disminución de estradiol. El AMH de las células granulosas del ovario, en exceso, disminuye la actividad aromatasa e impide el paso de testosterona a estradiol en el ovario. Esa alteración de la esteroidogénesis ovárica por aumento de AMH, viriliza los ovarios por exceso de testosterona. Figura modificada de cita bibliográfica (37).

Y se ha visto que la testosterona aumenta en los ovarios cultivados con AMH, y disminuye el estradiol que secretan los ovarios de forma paralela al descenso de la actividad aromatasa. La disminución de actividad aromatasa en los cultivos de ovarios se ha utilizado, también, para medir la actividad AMH (37). Por tanto, la habilidad de MIS para cambiar la secreción de los ovarios inmaduros, fetales, por inhibición de la aromatasa, impide la normal esteroidogénesis ovárica y el paso de testosterona a estradiol (Figura 3), lo que explica la virilización que se produce con la aparición de tubos seminíferos por acción de la MIS, ya que es debido, realmente, a la testosterona ovárica acumulada. Ello explica, también, la virilización del «freemartin» en los bóvidos, porque ese gemelo hembra recibe a través de la placenta, cuando tiene ovarios inmaduros, tasas altas de MIS y de testosterona de su gemelo masculino. Mostrando todo ello que los niveles adecuados de MIS son importantes, también para la normal esteroidogénesis ovárica. Recientemente, se están realizando estudios que muestran la utilidad de las acciones en ovario de la AMH para utilizar su dosificación como marcador en ovarios poliquísticos o de la función ovárica en otras patologías (62, 63).

Expresión del receptor II de AMH ha sido encontrado en las células de Sertoli (9). Pero, además, como continúa, después de la inhibición del canal de Müller, produciéndose en los testículos a lo largo de la gestación, Jost ya sugirió un papel de esta hormona sobre las células de Sertoli inmaduras y en plena formación. Experimentos posteriores mostraron, efectivamente, en las células de Sertoli, una acción de la MIS sobre el control de maduración de las células germinales.

También se ha encontrado una acción de MIS, de forma independiente de cAMP, sobre la meiosis de los ovocitos de rata, produciendo una inhibición que puede ser revertida por anticuerpo anti-MIS y por EGF (factor de crecimiento epidérmico) (64), lo cual muestra la especificidad de la acción. Estos encuentros sobre el control de MIS sobre la maduración de células germinales en ambos, machos y hembras, podrían, en el futuro, ser aplicables como anticonceptivo, con menor riesgo que los actuales.

De otros efectos de MIS, por exceso o defecto de la hormona, hablaremos al exponer las investigaciones con animales transgénicos

y en los que no expresan MIS (animales *knock-outs*). Pero de cualquier forma, estos resultados ilustran el crítico papel que MIS puede tener en la morfogénesis gonadal, lo cual puede afectar, secundariamente, a la diferenciación de los genitales externos.

3.5.2. *Acción sobre la maduración del pulmón y descenso de los testículos*

En humano, el síndrome de fallo respiratorio del recién nacido, el cual es secundario a inmadurez pulmonar por deficiencia de surfactante, ocurre más frecuentemente en machos que en hembras (65). Los andrógenos inhiben la síntesis de fosfatidilcolina, el cual es un fundamental componente del surfactante pulmonar (65). Como MIS tiene niveles altos en el feto en la última parte de la maduración del pulmón, en la que la testosterona desciende, se estudiaron los efectos de MIS sobre la acumulación de fosfatidilcolina. Fragmentos de pulmón de fetos femeninos se incuban con testículos fetales o con ovarios, o bien con concentraciones de MIS. Se obtiene que tanto los fragmentos de testículo fetal, o el MIS añadido, suprimen la acumulación de fosfatidilcolina cuando se comparan con los pulmones incubados con ovario o con buffer. Lo mismo se obtiene si a fetos de 19 días se les inyecta MIS. Se cree que el MIS actúa por existir sus receptores en el pulmón. Y esta cuestión se sigue investigando ya que sería la causa de la frecuencia en los neonatos masculinos de la deficiencia pulmonar. Actualmente, se sugiere que serían los pulmones un fácil órgano para el estudio de los receptores de MIS (9, 10). Además, la existencia de esos receptores han llevado al estudio de la posibilidad de utilización de AMH en cánceres de pulmón (9).

Por otra parte, la primera etapa de desplazamiento de las gónadas hacia los riñones ocurre muy pronto en la embriogénesis en ambos sexos, pero, después, el movimiento transabdominal de los testículos, como un resultado de su crecimiento, está bajo control de la MIS. Si bien, posteriormente, el desplazamiento testicular ya está regido por andrógenos. Todo ello es muy patente en pacientes con el llamado síndrome persistente de conductos müllerian (PMDS) (*persistent Müllerian duct syndrome*), en el que se secreta normalmente la sustancia inhibidora de müllerian o MIS, pero estos pacientes tienen resistencia a su acción por defecto del receptor de MIS o

por mutación del gen. En humano, este síndrome es heterogéneo, unos pacientes tienen niveles bajos de MIS, otros normales, o bien no, y otras veces carecen de MIS bioactivo por mutaciones en el gen de MIS o de su receptor (10). Y todas estas anomalías conducen a mala localización de los testículos con alto emplazamiento. Pero estos pacientes con testículos abdominales, no descendidos, se ha visto que tienen niveles anormales de MIS en plasma en diversas etapas de su desarrollo (10).

3.5.3. *MIS en el adulto*

Aunque la principal actividad del MIS es provocar la regresión del conducto müllerian en embriones machos, este factor se sigue produciendo en testículos adultos. Los ovarios empiezan a producir bajos niveles de MIS ya en etapas próximas al nacimiento, pero son difíciles, realmente, de detectar antes de la pubertad y periodo adulto porque es, entonces, cuando estos niveles son claramente medibles. Uno de los grandes desafíos de la investigación sobre la MIS es precisamente comprender las otras funciones de ella. Y ha sido el estudio de ratones transgénicos y *knock-out* de MIS lo que ha permitido señalar su importante papel en la esteroidogénesis y la función ovárica. Observando los fenotipos de ratones manipulados para sobre-expresar o anular MIS o su receptor II, se ha postulado un efecto paracrino del MIS en la diferenciación y funcionalidad de las células de Leydig. En particular, se ha implicado a MIS en la diferenciación desde células progenitoras a células de Leydig inmaduras (66).

3.5.4. *Estudios actuales sobre modelos de animales transgénicos y knock-out del MIS*

Actualmente, se han realizado ya multitud de estudios sobre animales que hiperexpresan MIS, transgénicos, o que no la expresan, *knock-out*, fundamentalmente en ratas y ratones. Estos estudios están aclarando muchas de las acciones que hemos ya descrito (Figura 7).

La sobre-expresión de MIS en ratones hembras provocó un fenotipo hembra con atrofia vaginal y ausencia de útero y trompas de

Falopio (46), confirmando *in vivo* que la expresión de niveles normales de MIS es suficiente y necesaria para la regresión del conducto mülleriano. Los machos que sobre-expresan MIS también presentan anomalías, como una escasa virilización externa, insuficiente desarrollo del conducto wolffiano y falta de descenso de los testículos, probablemente debido a una hipoplasia de las células de Leydig desencadenada por una exacerbada esteroidogénesis (46).

La función de MIS y la especificidad de su receptor tipo II ha quedado inequívocamente demostrada con la obtención de modelos *knock-outs* para MIS (67), e independientemente, en modelos *knock-outs* para el receptor tipo II (68), porque en ambos modelos se producen fenotipos idénticos con retención de los conductos müllerianos. Estos estudios han permitido revelar el papel de MIS y su receptor en el desarrollo y diferenciación de las células de Leydig. Produciendo la falta de MIS en adultos hiperplasia de dichas células y tumores de las células de Leydig que no son frecuentes.

**ESTUDIO SOBRE ANIMALES
TRANSGÉNICOS Y KNOCK-OUT**

- Exceso de AMH (transgénicos)

(Produce anomalías en fenotipo en ambos sexos)

- Defecto de AMH (knock-out)

**a) Ambos anulaci ón de AMH o de su receptor
específico II retenci ón de conductos Müllarian en
machos**

**b) Aclaran papel de AMH y receptor II sobre células de
Leydig**

Figura 7. El estudio de animales transgénicos que hiperexpresan AMH permite *in vivo* observar las consecuencias en adulto del exceso de AMH. Los animales *knock-out*, los que no expresan AMH o no expresan su receptor específico II, han permitido la observación *in vivo* de la regresión del canal de Müller como acción específica de la hormona AMH y, también, sus acciones reguladoras sobre las células de Leydig.

3.5.5. *Posible acción sobre la célula cancerosa*

En 1950 Hamilton y Teng (69) describieron el concepto de muerte celular programada o apoptosis, y, después, fue descrita la regresión de los conductos müllerian como un ejemplo clásico de apoptosis producida, durante la organogénesis, en la remodelación de tejidos. Este proceso es el que se sigue, en el mundo animal, para eliminar las membranas interdigitales en muchas especies, en la modelación de brácteas y en muchos otros órganos. Está caracterizado por la formación intracelular de partículas ricas en lisosomas, las cuales preceden a la fagocitosis por las células vecinas. Por el microscopio electrónico se puede seguir la regresión de los conductos müllerian y, claramente, visualizar el proceso de autofagocitosis. También se ha seguido el proceso en estudios *in vitro* realizados en cultivo con fragmentos de testículos fetales.

Uno de los primeros fenómenos que se aprecia es la rotura de las membranas basales, como primer signo de canales müllerian en regresión. La fragmentación va acompañada de desaparición de fibronectina y separación de células epiteliales que pasan hacia el mesénquima (9). Con la formación de una transformación epitelial-mesenquimal que se incorpora en el mesonephros, el cual, finalmente reabsorbido, también desaparece. Hay un cruzamiento entre capas epiteliales y mesenquimáticas para que los conductos müllerian desaparezcan. Actualmente, está totalmente establecido que MIS induce apoptosis en las células epiteliales de los canales müllerian por un mecanismo paracrino, ya que se ha encontrado el receptor II de MIS en zonas mesenquimáticas (9). También se conoce que la parte de los conductos müllerian que, en las hembras, se convierten en tubos de Falopio son más sensibles a la acción regresiva de MIS (70).

Este papel de MIS, como inhibidor del crecimiento celular, despertó, en seguida, la sospecha de que quizá podría, postnatalmente, continuar su acción sobre tejidos que hubieran sido originados en los conductos müllerian, y se pensó que quizá podría, postnatalmente, continuar su acción sobre tejidos tumorales que hubieran sido originados en dichos conductos. Se sugirió que se podrían suprimir así proliferaciones neoplásicas. Es decir, el posible uso terapéutico de MIS como represor de tumores. Todo ello ha estimulado, sin duda, el estudio de esta hormona.

Realmente, hoy se piensa que el estudio de los mecanismos responsables de la regresión de los conductos müllerian debe facilitar, y ser un modelo, para encontrar terapéuticas para los tumores ováricos. La histología de los conductos müllerian coincide con la hallada en los carcinomas más corrientes de ovario, los cistadenocarcinomas, los cuales son llamados, frecuentemente, tumores müllerian (70).

Carcinomas epiteliales ováricos han sido estudiados, ya que ellos, histológicamente, aparecen como tejidos derivados de los conductos müllerian. Estos tumores representan, en humano, el 95% de los carcinomas ováricos y ocurren fundamentalmente en ovarios postmenopáusicos después que la producción de MIS en ellos cesa.

Se han realizado muchos estudios al respecto. Ya en 1979 fue inhibido un carcinoma humano ovárico por MIS bovino parcialmente purificado (71). También se encontró la inhibición de crecimiento de una colonia de células procedente de un carcinoma humano por MIS bovino (72) y, también, inhibe el MIS de bóvidos distintos cánceres ováricos, endometriales y de otro tipo, *in vitro* (9, 10). De todos estos estudios se concluyó que el método de purificación de la hormona anti-müllerian o MIS era muy importante para su acción inhibidora en los carcinomas ováricos. Se ensayaron purificaciones de la hormona por cromatografía de inmunoafinidad que parecía tener un 95% de pureza después de hacer una electroforesis en gel de poli-acrilamida. Se concluyó que la purificación por cromatografía de inmunoafinidad, seguida de una simple elución ácida (73) parecía ser efectiva para inhibir una variedad de tumores ginecológicos *in vivo e in vitro* (74). En todos estos trabajos se ha visto que es útil utilizar MIS en terapéutica de tumores sometiendo, previamente, la molécula a proteólisis, ya que, como mencionamos anteriormente, el fragmento C-terminal de la molécula de MIS es más activo. Pero una limitación de usar el fragmento C-terminal es que *in vivo* es más inestable que la molécula entera, porque la existencia del fragmento N-terminal da estabilidad a la molécula de MIS. Por ello parece que un sistema óptimo de utilización de MIS *in vivo* sería que la rotura y activación molecular de MIS ocurriera en el tumor mismo. Por esta causa se está trabajando para encontrar la enzima proteolítica endógena en los conductos müllerian que rompa la hormona MIS en ellos (9, 10).

3.5.5.1. MIS como marcador patológico

Finalmente hay que señalar la gran utilidad actual de utilizar los niveles plásmáticos de MIS como marcadores de tumores de ovario juveniles y postmenopáusicos. Los niveles de MIS son enormemente elevados en plasma en mujeres con tumores en las células granulosa ováricas (75) y lo mismo sucede en los hombres con tumores que tienen su origen en las células de Sertoli (76). Actualmente, el ensayo enzimático ELISA debe ser usado para detectar tumores incipientes que luego son explorados tomográficamente o por resonancia magnética. En tumores ováricos juveniles ello es más eficaz que utilizar los niveles de estradiol (75).

Y, evidentemente, es muy útil utilizar los niveles en plasma de MIS para evaluar y diagnosticar pacientes con desórdenes de intersexo (77), producidos por insensibilidad a los andrógenos o alteraciones en la esteroidogénesis, particularmente, en niños o jóvenes, en los cuales los niveles de testosterona son fluctuantes y sólo pueden ser evaluados estimulando con gonadotropina coriónica o LH (hormona pituitaria gonadal). La valoración de los niveles de MIS son definitivos en todos los casos de pacientes con ambigüedad genital masculina. Dada su importancia hay que señalar que en 1999 en *J. Clinical Endocrinology and Metabolism* se publicó, firmado por treinta científicos, el estudio de 107 casos de pacientes con patología intersexual que utilizaron el MIS como marcador (77).

Todas estas funciones de MIS como marcador de patologías o en la terapéutica de tumores, así como el gran interés de su estudio para llegar a comprender sus posibles aplicaciones futuras, fueron denunciadas, en el 2006, en un artículo del *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (78).

4. CONCLUSIONES

De toda esta exposición hemos de destacar que el estudio de la diferenciación sexual de mamíferos es un muy relevante ejemplo de la interacción de genes con factores externos, hormonas, que producen toda una programación génica que es la causante del dimorfismo sexual. Esta interacción tiene como resultado, a nivel periférico,

la morfogénesis de gónadas masculinas y femeninas y, también, la diferenciación del hipotálamo a nivel cerebral. En la periferia las gónadas, sin la intervención de las secreciones de los testículos fetales, la testosterona y la hormona anti-müllerian, los embriones genéticamente femeninos (XX) o masculinos (XY) se desarrollarían femeninos.

En la diferenciación sexual cada etapa de diferenciación es una consecuencia de la anterior de forma muy dependiente y gradual. La etapa de desarrollo del sexo genético, durante la fecundación, con la existencia, o no, del cromosoma Y determinará la diferenciación del testículo en la etapa gonadal y, posteriormente, las secreciones de las gónadas rigen la determinación del fenotipo con todos los caracteres secundarios sexuales en ambos sexos.

Todo lo enunciado por el Profesor Jost en 1947 se ha cumplido exactamente. Después de los trabajos iniciados, fundamentalmente, por Gorski, en 1965, conocemos, además, que lo mismo que sucede en el dimorfismo gonadal por influjo de las secreciones del testículo fetal, también la testosterona fetal logra, a nivel cerebral, la diferenciación dimórfica del hipotálamo, en hipotálamo femenino y masculino, y como consecuencia modifica las secreciones neuroendocrinas y la conducta sexual. Dicho dimorfismo sexual cerebral estamos ahora aún comenzando a descubrirlo y estudiarlo. En este dimorfismo sexual cerebral se instalan diferencias de conectividad sináptica con implicación de neurotransmisores todavía no conocidas en toda su complejidad y sabemos, también, que la testosterona, o mejor el estradiol proveniente de ella, tiene acciones estructurales en determinadas zonas del cerebro, lo cual da diferencias en el volumen y número celular de ellas, parece ser que por inhibición de la apoptosis celular, con diferencias significativas en ambos sexos (35). También está claro que en periodo adulto las hormonas sexuales tienen una acción *activadora* de los circuitos neuronales cerebrales que ellas mismas son capaces de establecer, de forma irreversibles, en etapas inmaduras.

En estas épocas tempranas las modificaciones no se limitan pues, como se pensó en principio, a conformaciones sutiles de tipo conectividad cerebral sino a profundas conformaciones estructurales que modifican el volumen de determinadas zonas en el cerebro. Es decir,

en periodos inmaduros la acción de las hormonas gonadales a nivel cerebral es de *organizadoras* de los circuitos neuronales que se están conformando. Aunque, actualmente, muchos de estos procesos cerebrales nos son todavía desconocidos (34, 79).

Hoy, en el momento en que las finas técnicas de la biología molecular están permitiendo la clonación del gen de MIS y sus receptores, el descubrimiento de Jost planteado con visión estrictamente fisiológica, y realizado con técnicas quirúrgicas, resulta una aportación más sugestiva que nunca, con aplicaciones terapéuticas muy por encima de las que él podía vislumbrar. Además de su papel para aclarar patologías y anomalías de intersexualidad, con ser ya éstas enormemente útiles y necesarias, parece que, en este momento, estamos comenzando a descubrir facetas del *factor de Jost* que no sabemos aún donde nos llevarán.

En el año 1989 el Profesor Jost vino a Madrid a un Congreso Internacional de Bioquímica Perinatal organizado por el Doctor José Manuel Cuezva y por mí y subvencionado por la Fundación Ramón Areces (80), y dio una espléndida conferencia sobre su hormona. En el coloquio le pregunté qué más acciones se presumía que podía tener dicha hormona, sonriendo me dijo: «*probablemente acciones sobre las secreciones de la corteza suprarrenal*» ... no he encontrado, hasta el momento, nada realizado al respecto pero, sin embargo, son evidentes, ahora, sus acciones en la esteroidogénesis en el ovario, en periodo postnatal y, también, sobre las células de Leydig. El tiempo dirá si, también, las tiene sobre la esteroidogénesis de las hormonas suprarrenales.

Para terminar, y a título de sugerencia: ambas secreciones testiculares del feto, testosterona y MIS, producen y rigen el dimorfismo sexual gonadal, que hemos llamado periférico, pero sólo conocemos, hasta el momento, que la testosterona diferencia el hipotálamo, y aunque la hormona anti-müllerian actúa de forma paracrina en la regresión de los conductos de Müller y a pesar de ello, quizá podemos preguntar, ¿encontraremos en el futuro alguna acción de AMH en el cerebro? ¿existirán en él sus receptores que acabamos de descubrir?... Dejo la pregunta en el aire.

De cualquier forma que sea, el estudio de la hormona anti-müllerian nos está, sin duda, ayudando a aclarar esa intrincada familia de

las TGF β , absolutamente importantes en los procesos neoplásicos. Todas estas consideraciones ponen de relieve que el descubrimiento de la hormona anti-müllerian del Profesor Jost parece poder adquirir en el futuro dimensiones insospechadas.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta revisión se dedica a la memoria del Profesor Jost por su Magisterio. Trabajé en su laboratorio, aproximadamente, cuatro años, y me considero una de sus muchos discípulos. El Profesor Jost, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Ciencias de París, recibió en 1965 el Premio Científico de la Ciudad de París. También se le otorgó, finalmente, la Legión de Honor. Alfred Jost nos visitó y dió una Conferencia en esta Academia: Jost, A. (1978), «Les facteurs endocriniens de la croissance prénatale et néonatale», *Anal. Real. Acad. Farm.*, vol. XLIV, núm. 3, págs. 561-80.



Medalla conmemorativa del homenaje ofrecido en la Sorbonne por sus discípulos al Profesor Jost en París con motivo de su jubilación y de su elección para el Colegio de Francia. En el envés, izquierda, el busto del Profesor Jost y en el revés, derecha, la fachada del Colegio de Francia.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Pascual-Leone, A. M. (2008) *Desarrollo de mamíferos a la luz de los conocimientos científicos actuales: su interés sanitario*. Discurso leído en Sesión Inaugural el 17 de enero 2008 en la Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España, págs. 1-60.

2. Pascual-Leone, A. M. (2008) Síndrome metabólico y desarrollo perinatal: alteraciones corticosuprarrenales, en *Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas*. Edts. A. M. Pascual-Leone y J. M. Medina, Monografía XXIII, Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España y Fundación Ramón Areces, págs. 27-69.
3. Pascual-Leone, A. M. (2005) Control neuroendocrino del balance energético: el adiposito secretor, en *Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: patologías*. Editor: A. M. Pascual-Leone. Monografía XVIII. Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España, págs. 23-64.
4. Pascual-Leone, A. M. (1998) Nutrición y desarrollo: regulación de los factores de crecimiento IGFS. *Anal. Real. Acad. Farm.* 64: 347.
5. Pascual-Leone, A. M. (2007) Desarrollo fetal y neonatal, en *Procesos epigenéticos: postformación y factores externos*, págs. 45-89. Curso 23-26 de octubre de 2006. Coordinador: A. M. Pascual-Leone, Instituto de España, Madrid.
6. Jost, A. (1947) Recherches sur la differentiation sexuelle de l'embryon de lapin *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 36: 271-315.
7. Migeon, C. J. (1984) Organisation globale de la différenciation sexuelle masculine, en *Médecine de la reproduction masculine*. Ed. Schaison, G.; Bouchard, P.; Mahoudeau, J. F. Labrie Flammarion Médecine-Sciences, Paris, Francia, and Presses de l'Université de Montreal Canada, págs. 178-200.
8. Pfaff, D. W. (1970) Nature of sex hormone effects on rat sex behaviour: Specificity of effects and individual patterns of response. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 3: 49-358.
9. Teixeira, J., Maheswaran, S. & Donahoe, P. (2001) Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocrine Reviews.* 22 (5): 657-74.
10. Lee, M. M. & Donahoe, P. (1993) Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine Reviews.* 14: 152-64.
11. McEwen, B. S. (1976) Interactions between hormones and nerve tissue. *Scientifique American*, julio, págs. 48-58.
12. Pfeiffer, C. A. (1936) Sexual differences of hypophyses and their determination by gonads. *Amer. J. Anat.* 58: 195.
13. Hendricks, E. E. & Gerall, A. A. (1970) Effect of neonatally administered estradiol on development of male and female rats. *Endocrinology.* 87: 435.
14. Pascual-Leone, A. M. (1985) Efecto de las hormonas sobre la maduración cerebral, en *Curso Monográfico sobre Neuroquímica*. M. P. González, A. M. Pascual-Leone, M. J. López, B. Ribas, J. M. Culebras, M. T. Miras, Editorial Universidad Complutense de Madrid, pág. 71.
15. Pascual-Leone A. M. (1985) Interacciones entre el sistema nervioso y el endocrino, en *Curso Monográfico sobre Neuroquímica*. M. P. González, A. M. Pascual-Leone, M. J. López, B. Ribas, J. M. Culebras, M. T. Miras, Editorial Universidad Complutense de Madrid, pág. 303.
16. Gorski, R. A. & Wagner, J. W. (1965) Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. *Endocrinol.* 76: 226.
17. Pfaff, D. K. & Keiner, M. (1973) Atlas of estradiol concentrating cells in the Central Nervous System of the female rat. *J. Comp. Neurol.* 151: 121-156.

18. Pfaff, D. (1980) *Estrogen and brain function*. Edited by Spriger-Verlag, Heidelberg, Berlin.
19. Zigmond, R. E. & McEwen, B. S. (1970) Selective retention of estradiol by cell nucleus in specific brain regions of the ovariectomized rat. *J. Neurochem.* 17: 889-99.
20. Quadagno, D. M., Shryne, J. & OKerski, R. A. (1971) The inhibition of steroid induced sexual behaviour by intrahypothalamic actinomycin. *D. Horm. Behav.* 2: 1-10.
21. Gorski, R. A., Gordon, J. H. *et al.* (1978) Evidence for morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat. *Brain Res.* 148: 333-46.
22. Gorski, R. A., Harlan, R. E., Jacobson, C. D. *et al.* (1980) Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptica area. *J. Comp. Neurol.* 293: 529-39.
23. Raisman, G. & Field, P. M. (1971) Sexual dimorphism in the preoptica area of the rat. *Science.* 173: 731-33.
24. Corbier, P., Edwards, D. A. *et al.* (1992) The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 100: 127-31.
25. Pascual-Leone, A. M. (1985) Hipotálamo: neuronas endocrinas y secreciones internas, en *Curso Monográfico sobre Neuroquímica*, M. P. González, A. M. Pascual-Leone, M. J. López, B. Ribas, J. M. Culebras, M. T. Miras, Editorial de la Universidad Complutense, Madrid.
26. Pfaff, D., Arnold, A. *et al.*, edits. (2002) *Hormones, Brain and Behaviour*. San Diego. Academic.
27. McEwen, B. S. (2001) Invited reviews. Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanism. *J. Appl. Physiol.* 91: 2785-2801.
28. McEwen, B. A. & Alves, S. E. (1999) Estrogen action in the central nervous system. *Endocr. Rev.* 20: 279-307.
29. Sellix, M. T.; Egli, M. *et al.* (2004) Ovarian steroid hormones modulate circadian rhythms of neuroendocrine dopaminergic neuronal activity. *Brain Res.* 1005: 164-81.
30. Ter Horst, G. J. *et al.* (2009) Sex differences in stress response: focus in ovarian hormones. *Physiol. Behav.* doi: 10.1016/j.physiolbeh.2009,02.036.
31. Shupnik, M. A. (2002) Estrogen receptors, receptor variants and estrogen actions in the hypothalamic-pituitary-axis. *J. Neuroendocrinol.* 14: 85-94.
32. Rissman, E. F. (2008) Receptors alpha and beta in behavioural neuroendocrinology: beyond Yin/Yang. *J. Neuroendocrinol.* 20: 873-879.
33. Koehler, K. F.; Helguero, L. A. *et al.* (2005) Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocrin. Rev.* 26: 465-478.
34. Simerly, R. B. (2002) Wired for reproduction: Organization and development of sexually dimorphic circuits in mammalian forebrain. *Ann. Rev. Neurosci.* 25: 507-36.
35. Davis, E. C., Popper, P. & Gorski, R. A. (1992) The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Research.* 734: 10-18.
36. Jost, A. (1953) Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 8: 379-418.

37. Josso, N.; Cate, R.; Picard, J. Y. *et al.* (1993) Anti-Müllerian hormone: the Jost factor. *Recent Prog. Horm. Research.* 48: 1-58.
38. Lillie, F. (1916) The theory of freemartin. *Science.* 43: 611-13.
39. Wilson, D., Harrod, M. J., Golstein, J. L. *et al.* (1974) Familial incomplete male pseudohermaphroditism type I. Evidence for androgen resistance and variable clinical manifestation in a family with the Reifenstein syndrome. *N. Engl. J. Med.* 290: 1097-1103.
40. Picon, R. (1969) Action of the fetal testis on the development *in vitro* of the Müllerian ducts in the rat. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 58: 1-19.
41. Josso, N. (1973) *In vitro* synthesis of Müllerian-inhibiting hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis. *Endocrinol.* 93: 829-34.
42. Blanchard, M. G. & Josso, N. (1974) Source of the anti-Müllerian hormone synthesized by the fetal testis: Müllerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. *Pediatric Res.* 8: 968-971.
43. Picard, J. Y. & Josso, N. (1984) Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 34: 23-29.
44. Bezdard, J., Vigier, B. *et al.* (1987) Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. *J. Reprod. Fert.* 80: 509-516.
45. Hirobe, S., He, W. W. *et al.* (1992) Expression of Müllerian inhibiting substance mRNA in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinol.* 131: 854-62.
46. Behringer, R. R., Cate, R. L. *et al.* (1990) Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Müllerian inhibiting substance. *Nature (London).* 345: 167-170.
47. Massagué, J. (1990) The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6: 597-64.
48. Lfíy, M. A. & Oliff, A. (1991) Transforming growth factor β -Müllerian inhibiting substance family of growth regulators. *Cancer Invest.* 9: 325-36.
49. Derynck, R., Jarret, J. A., Chen, E. Y. *et al.* (1985) Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transforming cells. *Nature.* 316: 791-705.
50. Bercu, B. B., Morikawa, Y. *et al.* (1978) Increased secretion of Müllerian inhibiting substance after immunological blockade of endogenous luteinizing hormone releasing hormone in the rat. *Pediatric Res.* 12: 139-43.
51. Bercu, B. B., Morikawa, Y. *et al.* (1979) Inhibition of Müllerian inhibiting substance secretion by FSH. *Pediatric Res.* 13: 246-49.
52. Kuruda, T. Lee, M. M. *et al.* (1991) Müllerian inhibiting substance production and rutura is modulated by gonadotropins and steroids. *Endocrinol.* 129: 2985-92.
53. Voutilainen, R. & Miller, L. M. (1987) Human Müllerian inhibitory factor messenger ribonucleic acid is hormonally regulated in fetal testis and in adult granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 1:604-8.
54. Wrana, J. L., Attisano, L. *et al.* (1992) TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell.* 71: 1003-1014.

55. Kretzschmar, M. & Massagué, J. (1998) SMADS: mediators and regulators of TGF- β signalling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 691-96.
56. Chen X., Rubock, M. J. *et al.* (1996) A transcriptional partner for SMAD proteins in TGF- β signalling. *Nature.* 383: 691-96.
57. Teixeira, J., He, W. W., Shah, P. C. *et al.* (1996) Developmental expression of a candidate Müllerian inhibiting substance type II receptor. *Endocrinol.* 137: 160-165.
58. De Santa Barbara, P., Moniot, B. *et al.* (1998) Steroidogenic factor-1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 29654-550.
59. Parr, B. A. & McMahon, A. P. (1998) Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature.* 395: 707-710.
60. Visser, J. A., Olaso, R., Verhoef-Post, M. *et al.* (2001) The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Müllerian inhibiting substance signalling. *Mol. Endocrinol.* 15: 936-45.
61. Tsuji, M., Shima, H. *et al.* (1992) Effect of human recombinant Müllerian inhibiting substance on isolated epithelial and mesenchymal cells during Müllerian ducts regression in the rat. *Endocrinol.* 1331: 1481-88.
62. Chen, M. J., Yang, W. S. *et al.* (2008) The relationship between anti-Müllerian hormone, androgen and insulin resistance on the number of antral follicles in women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 23(4): 962-957.
63. Lie Fong, S., Lugtembourg, P. J. *et al.* (2008) Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian function in women after chemotherapy and radiotherapy for haematological malignancies. *Hum. Reprod.* 23(3): 674-678.
64. Ueno, S., Manganaro, T. F. *et al.* (1988) Human recombinant mullerian inhibiting substance inhibition of rat oocyte meiosis is reverted by epidermal growth factor in vitro. *Endocrinol.* 123: 1652-59.
65. Torday, J. S., Nielsen, H. C. *et al.* (1985) Sex differences in fetal lung maturation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 123: 205-8.
66. Lee, M. M., Seah, C. C., Masiakos, P. T. *et al.* (1999) Müllerian inhibiting substance type II receptor expression and function in periphery rat Leydig cells. *Endocrinol.* 140: 2619-27.
67. Behringer, R. R., Finegold, M. J. *et al.* (1994) Mullerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell.* 79: 415-25.
68. Mishina, Y., Rey, R. *et al.* (1996) Genetic analysis of the Müllerian inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev.* 10: 2577-87.
69. Hamilton, T. H. & Teng, C. S. (1965) Sexual stabilisation of Müllerian ducts in the chick embryo, in De Haan, R. I., Ursprung, H. eds., *Organogenesis New York Holt, Rinehart and Winston*, 681-700.
70. Scuffy, R. E. (1970) Recent progress in ovarian cancer. *Hum. Pathol.* 1: 73-98.
71. Donahoe, P. K., Swan, D. A., Hayashi, A. *et al.* (1979) Müllerian ducts regression in the embryo correlated with cytotoxic activity against human ovarian cancer. *Science.* 205: 913-915.
72. Fuller, A. F. J. Guy, S., Donahoe, P. K. *et al.* (1982) Müllerian inhibiting substance inhibits colony growth of a human ovarian carcinoma line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54: 1051-55.

73. Ragin, R. C., Donahoe, P. K. *et al.* (1992) Human Müllerian inhibiting substance enhanced purification imparts biochemical stability and restores anti-proliferative effects. *Protein. Expression. Purif.* 3: 236-245.
74. Chin, T., Parry, R. L. & Donahoe, P. K. (1991) Human anti-Müllerian inhibiting substance inhibits tumor growth *in vitro* e *in vivo*. *Cancer Res.* 51: 2101-2106.
75. Rey, R. A., Lhomme, C., Marcillac, I. *et al.* (1996) Anti-Müllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumours of the ovary, comparative study with serum α -inhibin and estradiol. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174: 958-65.
76. Rey, R. A., Sabourin, J. C. *et al.* (2000) Anti-Müllerian hormone is a specific marker of Sertoli and granulosa cell origin in gonadal tumours. *Hum. Pathol.* 31: 1202-8.
77. Rey, R. A., Bellville, C., Nihoul-Fekete, C. *et al.* (1999) Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum anti-Müllerian hormone measurement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 627-31.
78. Al-Qahtani, A. & Groome, N. P. (2006) Anti-Mullerian hormone: Cinderella finds new admirers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (10), Editorial: 3760-3752.
79. García Segura, L. M. (1996) Mecanismos celulares de la diferenciación sexual del cerebro, en *Hormonas, Instintos y Emociones*, dirigida por Botella Lusiá, J., JAF Tresguerres. Curso de Verano de El Escorial. Editorial de la Universidad Complutense.
80. Cuezva, J. M., Pascual-Leone, A. M. & Patel, M. S. eds. (1990) *Endocrine and Biochemical Development of the Fetus and Neonate*. Publicación de ponencias del Annual Meeting of the Perinatal Biochemical Group of the Spanish Biochemistry Society on Biochemical Development of the Fetus and Neonate, 15-18 diciembre 1988, Madrid. Organizadores: Cuezva, J. M. y Pascual-Leone, A. M., subvencionado por la Fundación Ramón Areces. Plenum Press New York.

*** Información de contacto:**

Doctora Ana M.^a Pascual-Leone Pascual.

Académica de Número y Vicepresidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.
C/ Torrelaguna, 125-3.º D.

28043 Madrid.

Email: apl@ranf.com

Cinética de liberación de cefalexina desde un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO₃

Javier Aragón Fernández^{1*}, Ramón González Santos¹, Gastón Fuentes Estévez²

¹ Laboratorio de Biomateriales. Departamento de Investigación-Desarrollo, Dirección de Química. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Ciudad de La Habana. Cuba.

² Centro de Biomateriales. Universidad de la Habana. Avda. Universidad, s/n, e/ G y Ronda, A.P. 6130. C.P. 10600. Ciudad de La Habana. Cuba.

Recibido el 21 de marzo de 2009.

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la cinética de liberación de cefalexina desde un biomaterial compuesto desarrollado recientemente, para demostrar que puede ser utilizado como un sistema de liberación controlada, durante periodos de tiempo prolongados. Además se ajustaron diferentes modelos matemáticos a los perfiles de liberación obtenidos en cada formulación, con el propósito de determinar el mecanismo mediante el cual ocurre la liberación de cefalexina desde un sistema de liberación compuesto. Se demostró que el modelo propuesto por *Peppas y Sahlin* fue el que mejor ajuste presentó, ya que tiene en cuenta el fenómeno de difusión tipo *Fickian* y el fenómeno de relajación de las cadenas poliméricas. En todos los casos se descartó el efecto *burst*, por lo que se puede afirmar que casi todo el medicamento se encuentra ocluido dentro de las formulaciones y no en la superficie de éstas. Se pudo

comprobar que la cefalexina es liberada mediante un fenómeno de difusión de tipo *Fickian* a través de los poros o canales formados en el sistema de liberación compuesto. Además, el fenómeno de relajación de las cadenas poliméricas no presenta una fuerte contribución a la liberación de cefalexina, pero su inclusión en la ecuación permite obtener un adecuado ajuste matemático.

Palabras clave: Biomateriales; Sistema de liberación; In vitro; Difusión Fickian.

ABSTRACT

Kinetics of cefalexiane release form biomaterials formed by HAP-200/POVIAC/CaCO₃

The main objective of this work is to study the kinetics of cefalexine release from a biomaterial compound developed recently, to show that it can be used as a controlled release system, for extended periods of time. Besides, different mathematical models were adjusted to the release profiles obtained in each formulation, with the purpose of determine the mechanism by which occurs the release of cefalexine from a composite release system. It was shown that the model proposed by Peppas and Sahlin was that the best fit presented, because, takes into account the phenomenon of Fickian diffusion and the phenomena of relaxation for polymeric chains. In all cases the effect burst was discarded, for what can affirm that almost all the medicine is occluded inside the formulations and not on the surface of these. It could be that the cefalexine is released through a phenomenon of Fickian diffusion through the pores or channels formed in the compound delivery system. Moreover, the phenomenon of relaxation for polymeric chains does not show a strong contribution to the release of cefalexine, but its inclusion in the equation, is necessary to obtain an appropriate mathematical adjustment.

Key Words: Biomateriales; Release system; In vitro; Fickian diffusion.

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace algún tiempo el desarrollo de biomateriales compuestos, capaces de actuar como sistemas de liberación controlada de fármacos (en lo adelante sistema de liberación compuesto), ha despertado la atención de los especialistas en las últimas décadas, debido a las diversas ventajas que estos presentan en la práctica médica (1). La incorporación de fármacos en los biomateriales implantables es sumamente importante, ya que en cualquier intervención quirúrgica el riesgo de infección, inflamación y dolor es muy elevado. Por lo que, si el medicamento es incorporado al implante, no cabe duda que éste actuará mayoritariamente de forma local sin perjudicar otras zonas del organismo, disminuyendo los efectos secundarios perjudiciales, con lo que se evitan periodos de tiempo prolongados en las terapias post-operatorias (2).

En casi todos los sistemas de liberación compuestos (matriz polimérica y relleno inorgánico), el componente polimérico es el principal encargado de controlar el proceso de liberación del fármaco o principio activo, mientras que el relleno inorgánico es el encargado de variar la cinética de liberación de los sistemas obtenidos.

Por otra parte, el estudio de la cinética de liberación de un fármaco que se encuentra ocluido dentro de un sistema de liberación compuesto es de considerable importancia en el desarrollo de estos sistemas, ya que permite calcular constantes que brindan una información muy útil, relacionada con el mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de liberación. Cuando se estudia un nuevo sistema de liberación compuesto hay que poner especial atención al elegir un adecuado modelo matemático que ajuste a los datos obtenidos en el perfil de liberación de dicho sistema. Primeramente, se deben evaluar varios modelos matemáticos que describan diferentes procesos de liberación, para luego proceder a interpretar las diferentes variables o constantes que se describen en estos modelos, teniendo en cuenta el coeficiente de regresión obtenido en cada ajuste.

El proceso de liberación de un fármaco ocluido dentro de un sistema de liberación compuesto puede llevarse a cabo mediante varios mecanismos (difusión y relajación o hinchamiento de las cadenas poliméricas). La difusión ocurre cuando un fármaco atraviesa el polímero que forma el sistema de liberación, estimulado por el gradiente

de concentración que existe entre el sistema de liberación compuesto y el medio circundante. Cuando el proceso de liberación de fármacos ocurre mediante un proceso controlado por el hinchamiento de un polímero, la matriz polimérica que inicialmente se encuentra en estado cristalino, sufre una transición vítrea y se forma un hidrogel. Este proceso está relacionado con la difusión de un fármaco desde y a través de dicho polímero, bajo difusión a contracorriente de agua o fluido biológico hacia el interior del polímero (3). En ambos casos los perfiles de liberación de estos sistemas se caracterizan por presentar una disminución de la velocidad de liberación con el tiempo, que se relaciona con la mayor distancia que tiene que recorrer el fármaco dentro de la matriz.

Generalmente, el proceso de difusión de solutos desde sistemas en equilibrio de hinchamiento (elastoméricos) cumple con la ley de Fick. Esta ley es cuantitativa y describe diversos casos de difusión de materia o energía en un medio en el que inicialmente no existe equilibrio químico o térmico, afirmando además, que la densidad de flujo de partículas es proporcional al gradiente de concentración según la ecuación 1.

$$J = -D \frac{\partial n}{\partial x} \quad (1)$$

Sin embargo, en sistemas elastoméricos donde no existe equilibrio, la difusión puede ser o no de tipo Fickian y en ocasiones la migración en estos sistemas, ha sido atribuida a la existencia de fenómenos de relajación macromoleculares lentos, inducidos por el proceso de hinchamiento.

Este fenómeno está relacionado con los tiempos finitos que necesitan las cadenas del polímero, para responder a la presión de hinchamiento osmótico y ordenarse, con el fin de acomodar las moléculas del disolvente que penetran en el sistema (3). Por consiguiente, dependiendo de la velocidad de relajación del polímero en el proceso de hinchamiento, la migración del soluto puede ser o no de tipo Fickian.

En muchos casos, los sistemas se ajustan a la ecuación 2, propuesta por *Higuchi* en 1963 (4); la cual describe el proceso de libe-

ración a partir de una de las caras de la matriz en condiciones de sumidero. *Higuchi*, también demostró que la fracción de medicamento liberado es función de la raíz cuadrada del tiempo y puede representarse de la siguiente forma:

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = K \cdot t^{1/2} \quad (2)$$

Donde: Mt/M_{∞} es la fracción de soluto que se ha liberado a un tiempo t y K es la constante de velocidad de liberación.

Una aproximación que también se utiliza con frecuencia para el análisis de liberación de medicamentos es la ecuación 3 propuesta por *Korsmeyer* en 1983 y *Peppas* en 1985 (5). Esta ecuación nace del intento de explicar mecanismos de liberación de medicamentos donde se presenta erosión o disolución de la matriz, y no es más que una forma generalizada de la ecuación de *Higuchi* que se expresa como:

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = K \cdot t^n \quad (3)$$

Donde K es una constante que incorpora características estructurales y geométricas del sistema de liberación y n es el exponente que indica el mecanismo de liberación del medicamento.

Cuando el valor de n es 0,50 la liberación del fármaco sigue un mecanismo de difusión de tipo Fickian (en este caso el perfil de liberación se ajusta a la ecuación 2) o transporte Caso I. Una difusión anómala o no Fickian se produce cuando los valores de n son mayores que 0,50 y menores de 1.

En los casos donde el sistema de liberación es un material poroso, la constante n puede tomar valores menores que 0,50, puesto que se combinan los mecanismos de difusión parcial a través de una matriz hinchada y a través de los poros llenos de agua (6). Además, valores de $n < 0,50$ denotan la existencia de otro proceso simultáneo al proceso de difusión. No obstante, *Peppas* sugiere que esta expresión podría aplicarse para el análisis fenomenológico de cualquier mecanismo de liberación, independientemente del mecanismo molecular específico de transporte del medicamento (5).

En el caso de $n = 1$ la cinética del sistema de liberación es de *orden cero* (ecuación 4) y el proceso de liberación es controlado por la relajación de las cadenas poliméricas. En este caso el mecanismo de transporte es particularmente interesante, debido a que la difusión se produce a velocidad constante, si no cambia la geometría del sistema durante el proceso de liberación (transporte Caso II).

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = K \cdot t \quad (4)$$

Donde K es la constante de velocidad de liberación (7).

En 1987 *Ritger y Peppas* propusieron una expresión semiempírica (ecuación 5) para estudiar la cinética de liberación de principios activos a partir de sistemas planos en los que tiene lugar un acoplamiento de los mecanismos *Fickian* y Caso II.

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = K_1 \cdot t^{1/2} + K_2 \cdot t \quad (5)$$

Donde K_1 representa la contribución del mecanismo *Fickian* y K_2 representa la contribución al mecanismo de relajación de las cadenas poliméricas (8).

Para describir el proceso de liberación de medicamentos *Lindner y Lippold* en 1995, modificaron la ecuación 3, adicionándole un término (b) para describir el efecto *burst*, que no es más que la liberación del fármaco que se encuentra en la superficie del sistema de liberación, el cual es liberado al medio inmediatamente después de estar en contacto con éste (9).

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = K_1 \cdot t^n + b \quad (6)$$

En 1989, *Peppas y Sahlin* modificaron la ecuación 5 propuesta por *Ritger y Peppas* en 1987 con el objetivo de generalizarla (6, 10, 11), y determinar la contribución del proceso de difusión *Fickian*, así

como la contribución del proceso de relajación de las cadenas poliméricas. Como resultado propusieron la ecuación biexponencial 7, que es independiente de la geometría del sistema de liberación.

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = K_1 \cdot t^n + K_2 \cdot t^{2n} \quad (7)$$

Donde n es el exponente de difusión Fickian para un sistema con cualquier forma geométrica (10).

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la cinética de liberación de cefalexina desde un biomaterial compuesto desarrollado recientemente (12), para demostrar que puede ser utilizado como un sistema de liberación, durante periodos de tiempo prolongados.

De igual forma se ajustaron los modelos matemáticos descritos anteriormente, a los perfiles de liberación obtenidos en cada formulación, con el propósito de determinar mediante que mecanismo ocurre la liberación de cefalexina desde un sistema de liberación compuesto en el periodo de estudio.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Obtención del sistema de liberación compuesto

Para obtener el biomaterial compuesto que actuara como sistema de liberación compuesto, se procedió a mezclar homogéneamente en un mortero de ágata, la fase sólida compuesta por HAP-200, CaCO_3 y cefalexina. Posteriormente, se humectó la mezcla con una disolución alcohólica de POVIAC al 39% hasta la formación de una pasta homogénea. Inmediatamente después, se adicionó agua destilada y se continuó mezclando, hasta que la pasta adquirió mayor consistencia y pudo colocarse en los moldes a ensayar (6 mm de altura y 12 mm de diámetro). Finalmente las formulaciones se dejaron reposar en una desecadora durante 24 horas a temperatura ambiente.

2.2. Planeamiento experimental

Con el objetivo de obtener diferentes perfiles de liberación se realizó un diseño de experimento factorial 3^2 , donde se variaron dos factores experimentales, el factor «contenido de POVIAC» (con tres niveles 15, 17,5 y 20%) y el factor «contenido de CaCO_3 » (con tres niveles 5, 10 y 15%), generándose una matriz experimental de nueve formulaciones a estudiar (Tabla 1), y como variable respuesta se escogió el coeficiente de difusión Fickian calculado para el tercer y décimo día, según el modelo que mejor ajustes brindó a los perfiles de liberación.

Tabla 1. **Composición de los biomateriales compuestos cargados con Cefalexina**

Formulación	POVIAC	CaCO_3	Cefalexina	HAP-200	Nomenclatura
	%				
1	15	5	10	70	P15-Ca5
2	17,5	10	10	62,5	P17,5-Ca10
3	17,5	5	10	67,5	P17,5-Ca5
4	17,5	15	10	57,5	P17,5-Ca15
5	20	15	10	55	P20-Ca15
6	20	10	10	60	P20-Ca10
7	15	10	10	65	P15-Ca10
8	20	5	10	65	P20-Ca5
9	15	15	10	60	P15-Ca15

Para el análisis estadístico de la matriz generada en el diseño de experimento propuesto, se prepararon cinco réplicas de cada formulación y el Análisis de Varianza se realizó mediante la tabla de ANOVA, utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS versión 5.1.

2.3. Ensayos de liberación *in vitro* de Cefalexina

Para obtener los perfiles de liberación se prepararon cinco réplicas de cada formulación, las cuales fueron colocadas en un

peso filtro y se les adicionó 10 mL de una disolución buffer de fosfato. Esta disolución fue preparada previamente, adicionando 8,0 mmol de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 2,0 mmol de KH_2PO_4 , 2,7 mmol de KCl y 13,7 mmol de NaCl en 500 mL de agua destilada y desionizada contenida en un frasco de polietileno de 1.000 mL. Posteriormente se traspasa cuantitativamente esta disolución a un matraz aforado de 1.000 mL y se enrasa con agua destilada y desionizada. El pH de esta disolución a 37° C es $7,40 \pm 0,05$. Luego todos los pesa filtros se taparon y se introdujeron en una incubadora *BOXCOULT* a $37 \pm 0,1^\circ$ C durante 10 y 30 días. Periódicamente la disolución buffer de fosfato en contacto con las formulaciones fue extraída completamente y reemplazada por una cantidad igual de disolución fresca. La disolución extraída fue conservada en frascos de vidrio herméticamente tapados y mantenidos a -20° C hasta el momento del análisis. Las extracciones se realizaron cada una hora durante las primeras ocho horas y cada veinticuatro horas entre el segundo y el décimo día. A partir del décimo día las extracciones estuvieron espaciadas no más de tres días.

Para determinar la cantidad de cefalexina liberada en cada instante de tiempo, se empleó una curva de calibración (5, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm) de cefalexina disuelta en una disolución buffer de fosfato. La determinación se realizó en un espectrofotómetro UV-Visible (*ULTROSPEC 2000*) a una longitud de onda de 262 nm.

3. RESULTADOS

3.1. Perfil de liberación de todas las formulaciones

Para comprender mejor el perfil de liberación de cada formulación, se decidió separar el análisis en dos grupos, el primero está formado por las formulaciones que se desintegraron físicamente entre el noveno y décimo día [formulación 1 (P15-Ca5), 7 (P15-Ca10), 8 (P20-Ca5) y 9 (P15-Ca15)], por lo que se decidió detener el estudio al cabo de los diez días. El segundo grupo está formado por las formulaciones 2 (P17,5-Ca10), 3 (P17,5-Ca5), 4 (P17,5-Ca15), 5 (P20-Ca15) y 6 (P20-Ca10), las cuales mantuvieron su forma física durante todo el tiempo de estudio (30 días).

Los resultados encontrados en el primer grupo, evidencian que la mayor parte de la cefalexina liberada al medio se produjo en los tres primeros días, ya que al cabo del tercer día se había liberado entre el 39 ± 1 y $49 \pm 5\%$ del fármaco ocluido, y al llegar al décimo día la liberación de cefalexina al medio oscilaba entre un 44 ± 1 y un $54 \pm 3\%$ (Tabla 2).

En el caso del segundo grupo, las formulaciones mantuvieron un perfil de liberación sostenido durante 21 días, y entre los días 21 y 30 la liberación de cefalexina al medio fue menor de un 3% (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidad máxima de cefalexina liberada a los 3, 10, 21 y 30 días

Formulación	3 días	10 días	21 días	30 días
	($\%$)			
P 15-Ca 5	47 ± 2	54 ± 3	—	—
P 17,5-Ca 5	40 ± 2	53 ± 3	57 ± 4	57 ± 5
P 20-Ca 5	41 ± 3	47 ± 3	—	—
P 15-Ca 10	49 ± 5	53 ± 5	—	—
P 17,5-Ca 10	29 ± 1	44 ± 3	50 ± 4	51 ± 4
P 20-Ca 10	27 ± 3	41 ± 4	50 ± 3	52 ± 3
P 15-Ca15	39 ± 1	44 ± 1	—	—
P 17,5-Ca 15	24 ± 5	36 ± 6	45 ± 5	47 ± 4
P 20-Ca 15	23 ± 3	36 ± 5	46 ± 4	49 ± 2

En la Figura 1, se puede apreciar el perfil porcentual de liberación de cefalexina en el tiempo, de todas las formulaciones hasta el décimo día (240 horas). Observándose que aquéllas que contienen un 15% de POVIAC comenzaron a disminuir la velocidad de liberación a partir del quinto día (120 horas) y la formulación que contiene un 20% de POVIAC y un 5% de CaCO_3 a partir del octavo día (192 horas). Todas estas formulaciones se desintegraron, debido a que al parecer un 15% de POVIAC no es suficiente para actuar como aglutinante y mantener la forma geométrica del sistema de liberación compuesto y en el caso de la formulación que contiene un 20% de POVIAC, la desintegración puede corresponderse a que el contenido de CaCO_3 es sólo de un 5%.

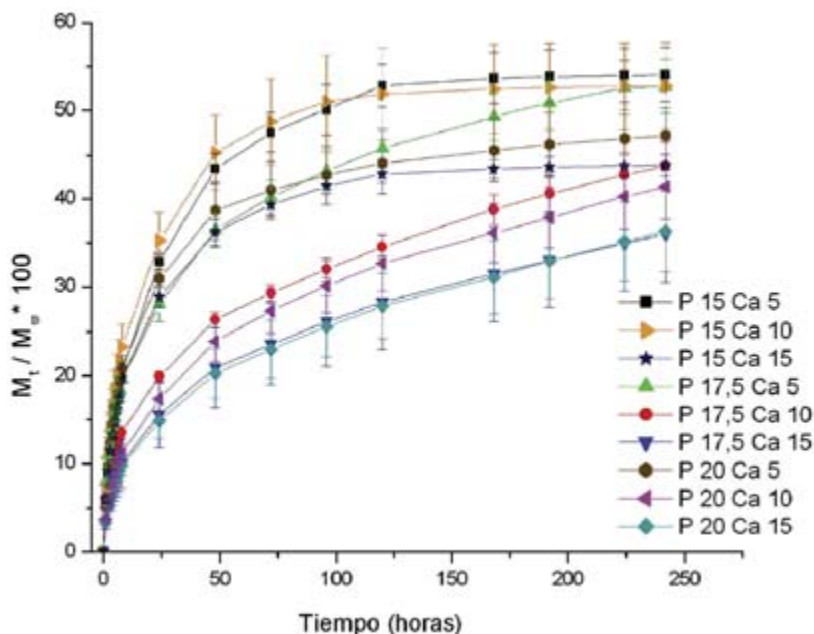


Figura 1. Perfil de liberación de cefalexina de todas las formulaciones hasta el décimo día.

Por otra parte, en la Figura 2 se puede observar el perfil de liberación de las formulaciones que mantuvieron su forma geométrica durante treinta días (720 horas). La formulación 3 (P17,5-Ca5) es la que mayor cantidad de cefalexina libera, debido a que sólo contiene un 5% de CaCO_3 , después le siguen las formulaciones 2 (P17,5-Ca10) y 6 (P20-Ca10) que presentan un perfil de liberación muy similar, mientras que en las formulaciones 4 (P17,5-Ca15) y 5 (P20-Ca15) la cantidad de cefalexina liberada en cada instante de tiempo es inferior.

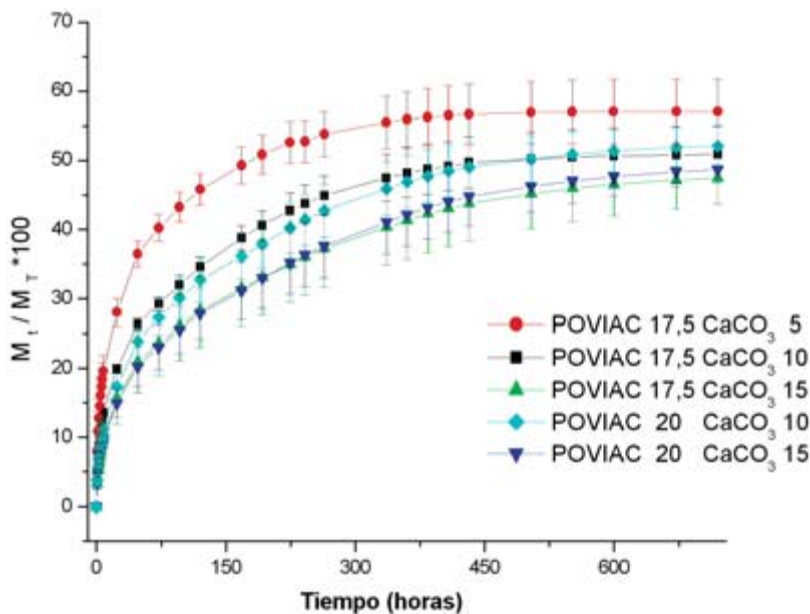


Figura 2. Perfil de liberación de cefalexina de las formulaciones 2, 3, 4, 5 y 6 hasta el día 30.

3.2. Ajuste de los perfiles de liberación obtenidos a los modelos matemáticos estudiados

Con el objetivo de analizar la cinética de los perfiles de liberación de cefalexina y los mecanismos asociados al proceso de difusión, se ajustaron los perfiles de liberación (hasta el décimo día) de todas las formulaciones a los modelos matemáticos descritos (Tabla 3).

3.3. Análisis del diseño de experimento

Para analizar el diseño de experimento propuesto se determinó el coeficiente de difusión mediante la ecuación propuesta por *Peppas y Sahlin* a los 3 y 10 días (Tabla 4).

Tabla 3. Coeficiente de correlación (r) de los modelos matemáticos evaluados hasta el décimo día

Modelo	Orden Cero	Higuchi	Korsmeyer y Peppas	Ritger y Peppas	Linder y Lippold	Peppas y Sahlin
Formulación	r					
P15-Ca5	0,86141	0,95257	0,97765	0,99653	0,98399	0,99954
P17,5-Ca5	0,90758	0,97753	0,99537	0,99829	0,99679	0,99974
P20-Ca5	0,85027	0,94447	0,97205	0,99587	0,98237	0,99965
P15-Ca10	0,83445	0,93557	0,97041	0,99817	0,97882	0,99976
P17,5-Ca10	0,93887	0,99109	0,99749	0,99716	0,99907	0,99989
P20-Ca10	0,94383	0,99343	0,99703	0,99939	0,99901	0,99955
P15-Ca15	0,84551	0,94261	0,97622	0,99833	0,98212	0,99949
P17,5-Ca15	0,94344	0,99317	0,99686	0,99870	0,99909	0,99947
P20-Ca15	0,95018	0,99522	0,99777	0,99893	0,99943	0,99983

* Se destaca en **negrita** las formulaciones que mejor ajuste presentaron en cada modelo y el modelo que mejor ajuste presentó.

Tabla 4. Tabla de ANOVA

	Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
n 3 días	A:POVIAC	0,0198375	1	0,0120125	5,15	0,0305
	B:CaCO ₃	0,0045375	1	0,0045375	1,18	0,2862
	AB	0,00015625	1	0,00015625	0,04	0,8417
n 10 días	A:POVIAC	0,01215	1	0,01215	7,09	0,0124
	B:CaCO ₃	0,00150417	1	0,00150417	0,88	0,3564
	AB	0,00050625	1	0,00050625	0,30	0,5909

4. DISCUSIÓN

Los resultados observados en la Tabla 2 evidencian que en las formulaciones pertenecientes al primer grupo, la velocidad de liberación de cefalexina comienza a disminuir considerablemente a partir del tercer día, mientras que en el caso de las formulaciones pertenecientes al segundo grupo, esto sucede a partir del día 21.

En todos los casos a medida que aumenta el contenido de CaCO_3 en las formulaciones con igual contenido de POVIAC se produce una disminución del contenido de cefalexina liberada para iguales instantes de tiempo (Figura 1), esto corresponde con lo reportado en la literatura en un estudio preliminar de liberación de ASA desde un biomaterial compuesto por HAP-200, CaCO_3 y POVIAC (13). Este resultado indica que el CaCO_3 actúa como agente retardador en el proceso de liberación de cefalexina.

Según el coeficiente de correlación obtenido (r) después de ajustar todos los modelos matemáticos, podemos afirmar que el modelo de *orden cero* no es el más apropiado para describir la liberación de cefalexina en estas formulaciones. Es importante señalar que este modelo fue propuesto para describir sistemas de liberación controlados solamente por la relajación de las cadenas poliméricas. Por lo que este resultado nos permite asegurar no solo que la velocidad de liberación de cefalexina no es constante en el tiempo, sino también que el proceso de liberación no es controlado por la relajación de las cadenas poliméricas.

Aunque los modelos propuestos por *Higuchi* en 1963, *Korsmeyer* en 1983 y *Peppas* en 1985 presentan buenos ajustes, en ellos hay que tener en cuenta una serie de limitaciones establecidas por los autores para validar su aplicación. *Higuchi* planteó, que la liberación del medicamento sólo ocurrirá desde una de las caras del sistema de liberación, mientras que *Peppas* y *Korsmeyer* consideran, que n es independiente de la concentración del medicamento, señalando que la ecuación fue propuesta sólo para su uso en sistemas donde la difusión del medicamento tiene lugar a través de una matriz polimérica. Estos autores establecieron que en dicha matriz no debe ocurrir el fenómeno de hinchamiento o contracción. En este caso se supone que en el sistema de liberación compuesto debe ocurrir el fenómeno de hinchamiento, debido a la presencia del POVIAC y la liberación de cefalexina tiene lugar a través de un sistema de liberación compuesto, formado por una matriz polimérica y dos materiales que actúan como relleno inorgánico. Además, en este caso no se puede considerar que la liberación de cefalexina tiene lugar solamente desde una de las caras de la formulación pues la altura de estas no se puede despreciar (6 mm).

Según la Tabla 3, los modelos propuestos por «*Ritger y Peppas*» y «*Lindner y Lippold*» mostraron buenos ajustes a los perfiles de liberación obtenidos. En ellos se destaca la preponderancia de la constante K_1 (contribución del mecanismo Fickian) frente al valor de la constante K_2 (contribución del mecanismo de relajación de las cadenas poliméricas), según la ecuación propuesta por *Ritger y Peppas* (Tabla 5). Este resultado demuestra que el mecanismo de liberación que predomina, es un mecanismo de difusión de tipo Fickian y no depende de la relajación de las cadenas polimérica, aunque es necesario tener en cuenta ambos fenómenos para alcanzar un buen ajuste.

Por otro lado, la ecuación propuesta por *Lindner y Lippold* evidencia que la cantidad de cefalexina presente en la superficie de las formulaciones es despreciable, ya que el término encargado de expresar el efecto *burst*, presenta valores pequeños y negativos (Tabla 5).

Tabla 5. Ajuste de los perfiles de liberación de cefalexina a las ecuaciones propuestas por «*Ritger y Peppas*» y «*Lindner y Lippold*» al término de 10 días

Modelo	<i>Ritger y Peppas</i>			<i>Lindner y Lippold</i>			
	$K_1 \cdot 10^{-2}$	$K_2 \cdot 10^{-3}$	r	K_1	n	b	r
P15-Ca5	8,0 ± 0,1	-2,9 ± 0,1	0,99653	0,15 ± 0,04	0,27 ± 0,04	-0,08 ± 0,04	0,98399
P17,5-Ca5	6,9 ± 0,2	-2,3 ± 0,1	0,99829	0,12 ± 0,01	0,29 ± 0,02	-0,03 ± 0,02	0,99679
P20-Ca5	7,5 ± 0,8	-2,9 ± 0,1	0,99587	0,15 ± 0,03	0,25 ± 0,03	-0,06 ± 0,04	0,98237
P17,5-Ca10	4,6 ± 0,1	-1,2 ± 0,1	0,99716	0,08 ± 0,06	0,33 ± 0,01	-0,02 ± 0,01	0,99907
P15-Ca10	8,8 ± 0,1	-3,5 ± 0,1	0,99817	0,17 ± 0,04	0,25 ± 0,03	-0,08 ± 0,05	0,97882
P20-Ca10	4,03 ± 0,06	-0,91 ± 0,04	0,99939	0,064 ± 0,005	0,35 ± 0,01	-0,02 ± 0,01	0,99901
P15-Ca15	7,1 ± 0,1	-2,80 ± 0,08	0,99833	0,14 ± 0,03	0,25 ± 0,03	-0,06 ± 0,04	0,98212
P17,5-Ca15	3,65 ± 0,07	-0,84 ± 0,05	0,99870	0,057 ± 0,004	0,34 ± 0,01	-0,02 ± 0,01	0,99909
P20-Ca15	3,40 ± 0,07	-0,73 ± 0,06	0,99893	0,052 ± 0,003	0,36 ± 0,01	-0,015 ± 0,004	0,99943

De todos los modelos estudiados, la ecuación propuesta por *Peppas y Sahlin* fue la que mejor ajuste matemático brindó al perfil de liberación de cefalexina de todas las formulaciones (Tabla 6). Apreciándose la preponderancia de la contribución del mecanismo de difusión de tipo Fickian (K_1) sobre la contribución del mecanismo de relajación de las cadenas poliméricas (K_2). De esta forma, se demuestra que el

mecanismo de difusión de tipo Fickian es el que predomina y no el de relajación de las cadenas poliméricas, lo que corrobora los resultados obtenidos anteriormente en la ecuación de *Ritger y Peppas*.

Tabla 6. Ajuste de los perfiles de liberación de cefalexina a la ecuación propuesta por *Peppas y Sahlin* al término de 10 días

Formulación	K_1	K_2	n	r
P15-Ca5	0,069 ± 0,002	-0,0022 ± 0,0002	0,55 ± 0,01	0,99954
P17,5-Ca5	0,088 ± 0,001	-0,0035 ± 0,0001	0,42 ± 0,01	0,99974
P20-Ca5	0,087 ± 0,004	-0,0040 ± 0,0004	0,45 ± 0,01	0,99965
P15-Ca10	0,094 ± 0,003	-0,0041 ± 0,0003	0,48 ± 0,01	0,99976
P17,5-Ca10	0,059 ± 0,001	-0,0014 ± 0,0001	0,41 ± 0,01	0,99989
P20-Ca10	0,045 ± 0,001	-0,0010 ± 0,0001	0,46 ± 0,01	0,99955
P15-Ca15	0,077 ± 0,002	-0,0033 ± 0,0002	0,47 ± 0,01	0,99949
P17,5-Ca15	0,041 ± 0,001	-0,0009 ± 0,0001	0,44 ± 0,01	0,99947
P20-Ca15	0,040 ± 0,001	-0,0006 ± 0,0001	0,43 ± 0,01	0,99983

En todas las formulaciones, el valor del exponente n osciló entre 0,41 y 0,55, confirmando que el proceso de difusión de cefalexina al cabo de los 10 días es de tipo Fickian y la presencia de poros dentro de las formulaciones provoca valores de n inferiores a 0,5, debido a un proceso de difusión parcial a través de la matriz polimérica hinchada y a través de los poros formados en el biomaterial (13, 14).

En la Tabla 7 se reportan los valores del coeficiente de difusión (n) calculados en la ecuación utilizada (*Peppas y Sahlin*) a los 3, 10 y 21 días. Como se puede apreciar, en todos los casos el valor de n disminuye en el tiempo, lo que evidencia que la liberación de cefalexina en los primeros 3 días depende de un proceso de difusión a través de la matriz polimérica hinchada, obteniéndose en casi todos los casos valores de n entre 0,44 y 0,6, que corresponde a la fracción de cefalexina que está ocluida en el material, pero muy próxima de la superficie. A partir del décimo día y hasta el día 21, los valores de n disminuyen hasta un intervalo de $0,41 \leq n \leq 0,45$, lo que evidencia que entre los días 10 y 21, la liberación de cefalexina va a depender básicamente de lo que pueda avanzar el frente de hinchamiento y el proceso de difusión se hace más lento, debido a que la cefalexina

debe recorrer un mayor camino para llegar al exterior. Cuando el medio externo penetra en el composite, el polímero que inicialmente presenta un estado vítreo, se hincha y su temperatura de transición vítrea puede alcanzar valores inferiores a la temperatura del medio que lo rodea, pasando a un estado tipo elastomérico. En estas condiciones, el soluto difunde desde las regiones hinchadas al medio externo y su liberación está controlada por la velocidad de desplazamiento y posición de la interfase vítrea/elástica.

Tabla 7. Coeficiente de difusión (n) obtenido de la ecuación de Peppas y Sahlin en diferentes instantes de tiempo

Formulación	3 días	10 días	21 días
P15-Ca5	0,60 ± 0,01	0,55 ± 0,01	—
P17,5-Ca5	0,44 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,410 ± 0,003
P20-Ca5	0,55 ± 0,01	0,45 ± 0,01	—
P15-Ca10	0,6 ± 0,1	0,48 ± 0,01	—
P17,5-Ca10	0,47 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,43 ± 0,01
P20-Ca10	0,50 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,45 ± 0,01
P15-Ca15	0,54 ± 0,01	0,47 ± 0,01	—
P17,5-Ca15	0,50 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,42 ± 0,01
P20-Ca15	0,48 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,42 ± 0,01

El análisis de varianza realizado mediante la tabla de ANOVA (Tabla 4) demostró que la variable «contenido de POVIAC» es la única que ejerce un efecto significativo (p -valor < 0,05) sobre n a los 3 y 10 días, confirmándose de esta forma que la matriz polimérica (POVIAC) es la encargada de controlar el proceso de liberación hasta el décimo día, ya que la cefalexina liberada sigue un mecanismo de difusión Fickian a través de la matriz polimérica.

5. CONCLUSIONES

Después de haber evaluado seis modelos matemáticos, se pudo comprobar que cinco de ellos presentaron buenos ajustes a los per-

files de liberación, aunque no todos fueron capaces de explicar la cinética de liberación de las nueve formulaciones estudiadas del sistema de liberación compuesto. Esto es debido a que habían sido propuestos para sistemas con características específicas y donde se tienen en cuenta diversos factores que fueron descartados en el *composite* estudiado. El modelo que mejor ajuste presentó fue el propuesto por *Peppas y Sahlin*, ya que tiene en cuenta el fenómeno de relajación de las cadenas poliméricas así como el fenómeno de difusión tipo Fickian, demostrando que la liberación de cefalexina ocurre mediante este último. El fenómeno de relajación de las cadenas poliméricas no presenta una fuerte contribución, pero su inclusión en la ecuación permite un adecuado ajuste matemático. Además, se pudo observar que casi todo el medicamento se encontraba ocluido dentro de las formulaciones estudiadas y no en la superficie de éstas, por lo que se descartó el efecto *burst* en todos los casos. Al mismo tiempo, se pudo comprobar que el POVIAC es el encargado de controlar el proceso de liberación de cefalexina dentro del sistema de liberación compuesto estudiado.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Sáez, V., Hernández, E., Ángulo, L. & Katime, I. (2004) Liberación controlada de fármacos. Hidrogeles. *Rev. Iberoam. Polim.* 5(2): 87.
2. Grenier, L. & González, R. (1994) Sistema biomaterial-droga para la liberación controlada de antibióticos. *Biomédica.* 14: 30-38.
3. Katime, I., Katime, O. & Katime, D. (2004) *Los materiales inteligentes de este Milenio: los hidrogeles polímeros.* Ed. Universidad del País Vasco. Bilbao.
4. Higuchi, T. (1963) Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drug dispersed in solid matrices. *J. Pharm. Sci.* 52(12): 1145-1149.
5. Korsmeyer, R. W. & Peppas, N. A. (1983) Swelling-Controlled delivery systems for pharmaceutical application: macromolecular and modeling consideration. *Controlled Release Delivery Systems* (T. J. Roseman y S. Z. Mansdorf ed.). Marcel Dekker. New York.
6. Doadrio Villarejo, A. & Vallet Regí, M. (2006) Liberación de fármacos en matrices biocerámicas. *Monografía XIX. Avances y perspectivas. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia.* Retrieved Marzo 10, 2009 from <http://www.ranf.com/publi/mono/mesoporoso.pdf>.
7. Ravelli, V. & Rossi, R. (1995) Prolonged release formulation technology. *Pharm. Manufact. Int.* 171-172.

8. Ritger, P. & Peppas, N. (1987) A simple equation for description of solute release I. *Fickian* and non-Fickian release from non-swelling device in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Controlled Release*. 5(1): 23-26.
9. Lindner, W. & Lippold, B. (1995) Drug release from hydrocolloid embedding with high or low susceptibility to hydrodynamic stress. *Pharm. Res.* 12: 1781-1785.
10. Pillay, V. & Fassihi, R. (2000) A novel approach for constant rate delivery of highly soluble bioactives from a simple monolithic system. *Control. Rel.* 67(1): 67-78.
11. Ruiz, A. (2005) *Evaluación de la liberación in vitro-in vivo de teofilina a partir de comprimidos matriciales elaborados con copolímeros de metacrilato de metilo y derivados almidonados*. Unpublished Doctor en Ciencias, Universidad de Sevilla, España.
12. Aragón, J. (2008) *Desarrollo y caracterización de un biomaterial capaz de sustituir el tejido óseo y liberar cefalexina simultáneamente*. Unpublished Máster en Ciencias, Universidad de la Habana, Cuba.
13. Aragón, J., Brizuela, N. & González, R. (2006) Perfil de liberación controlada de ASA en biomateriales compuestos de hidroxiapatita-POVIAC. *Revista CENIC*. 37(3): 197-181.
14. Aragón, J. (2008) Desarrollo y caracterización de un biomaterial capaz de sustituir el tejido óseo y liberar cefalexina simultáneamente. *Revista CENIC*. 39(2): 94-95.

*** Información de contacto:**

MSc. Javier Aragón Fernández.

Laboratorio de Biomateriales. Departamento de Investigación-Desarrollo, Dirección de Química.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

Avda. 25, Playa. Apartado Postal 6414.

Ciudad de La Habana. Cuba.

Email: javier.aragon@cnic.edu.cu

Implementing a dispensary in a rural area in Benin. Comparison between the new private centre and the old public centre's consultation

Jose Luis Álvarez^{1*}, Ruth Gil¹, Julia Aguiar², Claude Zinsou², Ángel Gil¹

¹ Area of Preventive Medicine and Public Health.
University Rey Juan Carlos, Madrid. Spain.

² Centre Sanitaire et Nutritionnel Gbemontin, Zagnanado. Benin.

Recibido el 1 de abril de 2009.

ABSTRACT

We present an example of a busy dispensary that provides nutritional care, outpatient services for all ages, treatment for medical emergencies, surgery and long term hospitalisation in a rural area of western Africa already covered by local tertiary care centres. We compare the different diagnoses in our dispensary in Zagnanado (Benin) and the public centres of the region. The main change observed is the success of the integration of a new private health centre that is fully equipped and ready to assist the population. The increasing demand and sustained investments have brought the patients to consider this dispensary as a reference for all health problems. We can see that private health care is essential to accurately estimate the burden of disease in developing countries not only in preventive and curative care but also in health education, which is essential in such settings and often not taken into consideration.

Key Words: Health services organisation and administration; Developing countries; Emergency and medical service; Ambulatory care.

RESUMEN

Puesta en marcha de un centro hospitalario en un área rural de Benín. Estudio comparativo con el centro público existente

Mostramos un ejemplo de implantación de un centro hospitalario con gran presión asistencial en una zona rural de África Occidental, donde ya existían centros de salud locales, que desarrolla actividades programadas y urgentes, tanto en las áreas de hospitalización como en las consultas externas, y proporciona desde actividad quirúrgica a cuidados nutricionales de la población a cualquier edad. A continuación comparamos los diferentes diagnósticos realizados en las consultas de nuestro dispensario en Zagnanado (Benín) y aquellos realizados en los centros públicos de la región. Los resultados obtenidos muestran el éxito de la integración del nuevo centro que está completamente equipado y listo para atender a la población. La demanda de los pacientes y la aportación continua de recursos han permitido que el centro disponga de una infraestructura y un equipamiento adecuado y hoy está considerado como punto de referencia para los problemas de salud de la región. Podemos observar que los centros de salud privados son esenciales para estimar fielmente la carga de enfermedad en los países en vías de desarrollo, algo necesario no sólo con fines curativos y preventivos sino también para las labores de educación en salud que a menudo no se tienen en cuenta en estos escenarios.

Palabras clave: Organización y administración de los servicios sanitarios; Países en vías de desarrollo; Cuidados médicos urgentes; Ambulatorios.

1. INTRODUCTION

Hospitals in less-developed countries tend to have large numbers of patients and limited staff or resources. Information about the needs of patients, the burden of many diseases and the magnitude of the health services provided are sparse or not available. Every day, international health organisations recognise and face the fact that new health care services are needed in Western Africa, especially in rural areas.

The University Rey Juan Carlos (Spain) has been cooperating with the Centre Gbemontin (Benin) for more than 10 years. The Centre Gbemontin is a 150 bed-hospital in a rural area in inland Benin. It serves the municipality of Zagnanado, which counts around 39.000 inhabitants, and is taking in more and more patients from the department of Zou (1.400.000 inhabitants) and even Benin's border countries such as Togo or Nigeria. Patients from other countries come especially for the treatment of Buruli Ulcer: the World Health Organization (WHO) has acknowledged the hospital as a pilot centre in the treatment of this illness (1).

The national health care system in Benin is structured in three levels: the central or national level, the departmental level and the peripheral level. The peripheral level is completely decentralised, is formed by a net of primary health care service (2) and is represented in Zagnanado with one Municipal Health Centre (Complexe Communal de Santé, CCS). This CCS holds just a few beds for long-term hospitalisation and several primary health day-centres in the different villages, and it is clearly insufficient for providing basic health care to the local population. However, there are a significant number of maternity and childbirth units in the area, which is the reason why the hospital of Gbemontin does not include this service.

In Benin, the density of physicians per 1.000 inhabitants is 0.045, far below the 0.217 density of the WHO African Region. The access to improved sanitation in rural areas of Benin is just 12% (28% for the WHO African Region). Moreover, one-fifth of the human health resources is devoted to the capital city. Private expenditure on health represents 44.4% (data of 2005) of the total expenditure on health. That means that private investments are vital for the country's health (3).

2. METHODS

Our goal was to compare the different treatments offered by the private and public centres in Zagnanado. After meeting with local health workers and reviewing available data from Benin and other countries (4, 5), it was decided that the first step should be comparing the external consultation of Gbemontin and all of the public centres in Zagnanado. We conducted an epidemiological observational retrospective study on the period from January 1st to December 31st 2007, recording all the patients that came to the external consultation in the private Centre of Gbemontin and the Public Health Centres in Zagnanado. We assumed that the population who came to both centres had the same socio-demographic characteristics and were mainly from the area of Zagnanado.

From this non-probabilistic sampling, we recorded the age, gender and possible diagnosis of each patient. Childbirth assistance was not included because the public centres completely fulfil these assignments. Seventeen diagnostic categories were described to group all different pathologies. We obtained a complete and suitable list of more than 60.000 patients, which was entered in Excel. All data were analysed with Epidat free software (version 3.1). For pathology distribution comparison, the χ^2 test was used.

3. RESULTS

In total, 36.563 patients attend the different public centres of Zagnanado, and 24.600 receive consultation consult at Gbemontin, so 40% of the patients chose to attend the new private centre. Between 2001 and 2007, the number of patients who consulted at Gbemontin increased from 20.701 to 24.600, which is an increase of 18.8%.

More than one-third (34%) of the people who came to our new dispensary were diagnosed with malaria, 14.45% suffered from respiratory diseases (mainly acute infections of the lower respiratory system) and 13.5% had no established diagnoses. Among the patients who went to the public health care centres of Zagnanado's commune, 42% had not established a defined diagnosis, 15% were diagnosed with respiratory diseases and 7.8% were diagnosed with malaria (Figure 1).

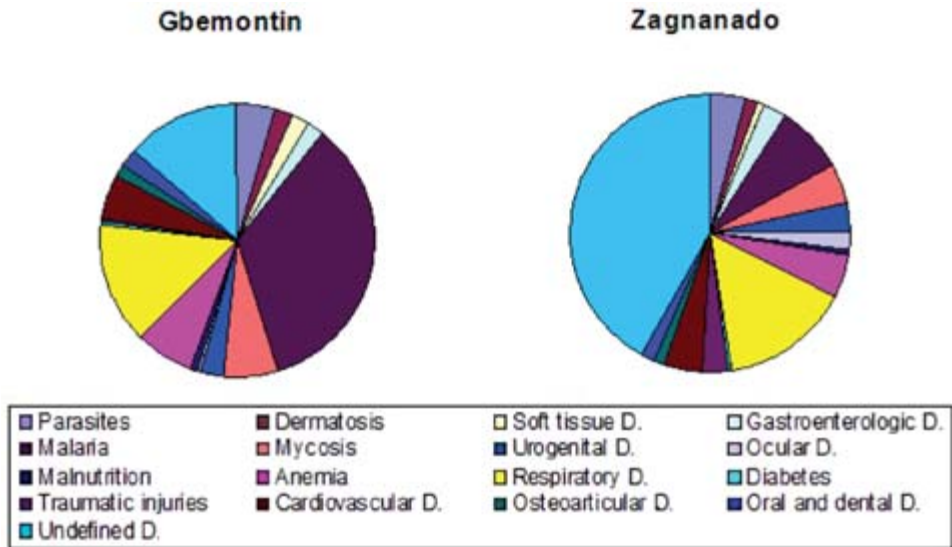


Figure 1. Different pathologies diagnosed at the private Gbemontin centre and the Public Health Centres of Zagnanado in 2007. Significant differences were found when comparing pathology distribution between the Gbemontin and Zagnanado centres for every diagnosis group ($p < 0.05$).

The patients who visited both centres were almost 50% children and 50% adult. In Table 1 we can see the different problems which drove both children and adults to go to both Health care centres. If we look at the differences between children (< 15 years of age) and adults, diseases such as mycosis, anaemias not caused by malaria, malnutrition and respiratory diseases were much more common in children. On the other hand, cardiovascular diseases represented 9% of diagnosed adults, while barely any children had this disease. The percentage of undiagnosed patients was higher in adults.

No significant differences were found according to gender, except in the well-known disease groups such as breast-diseases or urinary system infections, in both centres.

Table 1. Comparison of diagnosis in child and adult populations

	Zagnanado		Gbemontin	
	Children % (n)	Adults % (n)	Children % (n)	Adults % (n)
Parasites	4 (783) ^a	4 (704)	3 (308)	6 (854)
Dermatosis	1 (147)	2 (414)	1 (119)	3 (400)
Soft tissue D.	1 (200)	0 (67)	2 (223)	2 (303)
Gastroenterologic D.	4 (689)	2 (359)	3 (350)	1 (117)
Malaria	10 (1.878)	5 (983)	31 (3.315)	37 (5.050)
Mycosis	6 (1.162)	3 (505)	11 (1.191)	3 (386)
Urogenital D.	3 (521)	4 (713)	3 (275)	3 (405)
Ocular D.	2 (366)	2 (319)	0 (44)	0 (39)
Malnutrition	1 (264)	0 (8)	2 (246)	0 (0)
Anemia	8 (149)	2 (292)	13 (1.365)	2 (288)
Respiratory D.	21 (3.823)	9 (1.695)	22 (2.360)	9 (1.195)
Diabetes	0 (4)	0 (84)	0 (11)	1 (112)
Traumatic injuries	3 (479)	3 (632)	0 (22)	1 (86)
Cardiovascular D.	1 (101)	8 (1.530)	0 (17)	9 (1.250)
Osteoarticular D.	0 (23)	2 (398)	0 (20)	3 (362)
Oral and dental D.	0 (72)	3 (506)	1 (61)	4 (490)
Undefined D.	33 (6.023)	50 (9.327)	8 (880)	18 (2.456)
Total	(18 027)	(18 536)	(10 807)	(13 793)

^a numbers in brackets are the total diagnosis for each group.

4. DISCUSSION

The results showed several differences between the public Health Care Centres and the new private Centre of Gbemontin. Forty-two percent of all patients who came to the public centres did not receive a definitive diagnosis; this figure increases to 50% in the adult population. This clearly shows that despite an effort can be made to improve the quality of care and data collection. When applied to health centres, this effort can instantly improve the attention accorded to very needy patients.

The big difference observed in the diagnosis of malaria could be due to the fact that malaria drugs were cheaper in our centre

due to partial financing by volunteer organisations. Also, our centre specialises in surgery and other pathologies not covered by the private centres (6).

Compared with data from the WHO and the US Agency for International development (7, 8), we also found that the principal reasons for health visits in Benin are, in general, malaria and respiratory infections (37% and 17%); however, it is important to consider the large number of undiagnosed patients.

In this first study, we did not include hospitalised patients or look at patient mortality and seasonal epidemiology. Further studies should be designed to help determine the importance of this new private centre on these statistics.

The principles of our service are applicable to any hospital in a developing country. These principles are national and foreign investments, a well-trained staff that covers the health problems not covered already by public services (including new illnesses), preventive and curative care and effective education in health. Of course, a detailed evaluation program is also essential to success. Specific dispensary centres may represent a reasonable solution to a neglected component of primary health care in many developing countries, which, although with few health resources, would benefit from a more rational management than the current system provides.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank the catholique Mission in Zagnanado and the congregation of Hermanas Franciscanas Misioneras de la Divina Pastora who run the dispensary of Gbemontin and the workers of the Health Care Centers of Zagnanado, specially: Jacques, Bienvenu, Ernest, Hortense and Michel.

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation thanks to a FPU grant (beca de Formación de Profesorado Universitario).

6. REFERENCES

1. Sopoh, G. E., Christian Johnson, R., Chauty, A. & Dossou, A. D. (2007) Buruli Ulcer Surveillance, Benin, 2003-2005. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 1374-6.
2. Bichmann, W., Diesfeld, H. J., Agboton, Y., Gbaguidi, E. & Simshäuser, U. (2001) District health systems: users' preferences for services in Benin. *Oxford J. Health Policy Plan.* 6: 361-70.
3. WHO Country Health System Fact Sheet 2006 Benin [consulted 23/6/2008] Available in http://www.afro.who.int/home/countries/fact_sheets/benin.pdf
4. Kadaï, A., Sal, F. L., Andriantsara, G. & Perrot, J. (2006) The benefits of setting the ground rules and regulating contracting practices. *Bull World Health Organ.* 84: 897-902.
5. Bicklerl, S. W. & Rode, H. (2002) Surgical services for children in developing countries. *Bull World Health Organ.* 80: 829-835.
6. Kleinschmidt, I., Omumbo, J., Brie, O., van de Giesen, N., Sogoba, N., Kumarsenu Mensah, N. *et al.* (2001) An empirical malaria distribution map for West Africa. *Trop. Med. Int. Health.* 6: 779-86.
7. Who Mortality Country Fact Sheet 2006 [consulted 23/6/2008] Available in http://www.who.int/whosis/mort/profiles/mort_afro_ben_benin.pdf.
8. United State Agency for International Development Benin [consulted 23/6/2008] Available in <http://www.usaid.gov/bj/health/sector.html>.

* Información de contacto:

Doctor Jose Luis Álvarez.

Area of Preventive Medicine and Public Health.

Universidad Rey Juan Carlos. Facultad de Ciencias de la Salud.

Avda. de Atenas, s/n. 28922. Alcorcón (Madrid).

Telf.: (0034) 91 488 86 46. Fax: (0034) 91 488 89 55.

Email: joseluis.alvarez@urjc.es

Comportamiento electroquímico de la dopamina en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/glutaraldehído

Sabino Menolasina¹, Begoña Martín-Fernández²,
Francisco J. García-Íñigo², Beatriz López-Ruiz^{2*}

¹ Departamento de Análisis y Control, Laboratorio de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

² Sección Departamental de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Recibido el 21 de abril de 2009.

RESUMEN

En el presente trabajo se propone un nuevo método para la determinación indirecta de dopamina (DA), basado en la modificación del electrodo de carbón vítreo mediante adsorción sobre su superficie de una película de laponita (arcilla catiónica) y glutaraldehído (GA). Mediante voltamperometría cíclica (VC) se estudió el comportamiento electroquímico de la DA en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 6,0 y en presencia de tirosinasa (PPO). La presencia de tirosinasa permitió la determinación indirecta de DA, midiendo la corriente de reducción generada por el dopaminocromo formado a partir de la quinona procedente de la reacción enzimática entre DA y PPO a $-0,25$ V vs. Ag/AgCl (3 M). Esta corriente de reducción originada por el dopaminocromo es proporcional a la concentración de DA presente en el medio.

Palabras clave: Electroodos de carbón vítreo modificado; Dopamina; Tirosinasa; Voltamperometría cíclica.

ABSTRACT**Electrochemical behaviour of dopamine on a laponite/
glutaraldehyde modified glassy carbon electrode**

In this work a new method of dopamine (DA) detection, based on glassy carbon electrode modified by adsorption on the surface with a film of laponite (cationic clay) and glutaraldehyde (GA) is proposed. The electrochemical behaviour of the DA in a phosphate buffer solution 0,1 M, pH 6,0 of tyrosinase was studied by cyclic voltammetry technique (CV). The tyrosinase present in the solution allowed the indirect detection of DA monitoring the dopaminochrome coming from the quinone produced in the enzymatic reaction between the DA and tyrosine to -0.25 V vs. Ag/AgCl (3 M). The reduction current of the dopaminochrome was found to be proportional to the DA concentration.

Key Words: Modified glassy carbon electrodes; Dopamine; Tyrosine; Cyclic voltamperometry.

1. INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de compuestos químicos llamados neurotransmisores que son liberados por las neuronas. Entre estos neurotransmisores se encuentran la dopamina (DA), neurotransmisor que juega un papel fisiológico muy importante como mensajero químico a nivel neuronal. La enfermedad de Parkinson es producto de un desorden degenerativo crónico y lentamente progresivo a nivel cerebral, cuyos síntomas incluyen postura rígida, temblor de reposo y lentitud del movimiento voluntario, entre otros. En esta enfermedad la principal anomalía bioquímica es la deficiencia de DA en el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen). Para avanzar en el conocimiento de la patología y tratamiento de esta enfermedad y otras que se producen como consecuencia de la variación de la concentración de DA en ciertas regiones del cerebro se necesitan métodos eficaces y seguros de determinación de DA. Es por todo ello que el comportamiento electroquímico de este neurotransmisor reviste tanto interés (1, 2).

Para mejorar la selectividad en la detección de DA se han desarrollado muchos métodos relacionados con el pretratamiento y modificación de superficies electródicas para su uso como sensores electroquímicos (3-8).

Las arcillas son materiales que se originan de la descomposición de rocas, como partículas pequeñas y superficie lisa, son silicatos hidratados de alúmina. La laponita ($\text{Si}_8[\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.5}\text{H}_4\text{O}_{24}]^{0.7}\text{Na}^{0.7+}$), es una arcilla catiónica que presenta una estructura laminar con cationes intercambiables en su espacio interlaminar. Esta arcilla ha sido utilizada con éxito como sistema de inmovilización de enzimas destinadas a la fabricación de biosensores amperométricos enzimáticos (9).

En el presente trabajo se propone la modificación de un electrodo de carbón vítreo mediante adsorción en su superficie de una película de laponita-glutaraldehído y su aplicación en la detección de DA.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

La tirosinasa con una actividad de 1530 UI/mg de sólido fue suministrada por Sigma. La dopamina y el glutaraldehído (GA), disolución acuosa 25% por Fluka. Todos los reactivos fueron utilizados sin ningún tratamiento adicional de purificación. El agua utilizada fue de calidad Milli Q 18 MW (Millipore, Milford, MA, USA).

2.2. Aparatos

Los voltamperogramas se realizaron en un potenciostato galvanostato Autolab PGSTAT12 y una celda de vidrio de un compartimiento y tres electrodos. Un electrodo de Ag/AgCl (3 M) utilizado como electrodo de referencia y un alambre de platino como electrodo secundario. Como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de disco de carbón vítreo ($d = 3 \text{ mm}$) modificado.

2.3. Tratamiento del electrodo de carbón vítreo

El electrodo de disco de carbón vítreo ($d = 3 \text{ mm}$), utilizado como electrodo de trabajo, se sometió en primer lugar a un tratamiento químico por inmersión del mismo en una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (1:1) durante 10 segundos y posterior lavado con abundante agua desionizada. Finalmente se pulió con alúmina $0,05 \text{ mm}$, usando agua desionizada como lubricante. Terminada la limpieza mecánica, se sometió al electrodo a ciclos entre $-0,2 \text{ V}$ y $0,6 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl (3 M) en una disolución tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ pH $6,0$, cincuenta barridos a 200 mV s^{-1} .

2.4. Tratamiento de la celda electroquímica y del material de vidrio utilizado

Todo el material de vidrio utilizado y la celda electroquímica fueron lavados inicialmente con detergente, posteriormente con una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (1:1) durante 10 minutos y finalmente con abundante agua desionizada. Este procedimiento se repitió siempre que se sospechara una posible contaminación del material de vidrio o de la celda.

2.5. Preparación del electrodo de carbón vítreo

Una vez terminada la limpieza del electrodo de carbón vítreo según los pasos descritos anteriormente se procedió a la modificación de su superficie con laponita y glutaraldehído según el siguiente procedimiento:

- **Modificación con laponita.** Se preparó una suspensión de laponita añadiendo 2 mg de laponita en 1 mL de agua desionizada y se depositaron aproximadamente $25 \text{ }\mu\text{L}$ de dicha suspensión sobre la superficie del electrodo. Se le aplicó aire caliente hasta la total evaporación del líquido, quedando una fina película de laponita adsorbida sobre la superficie electródica.
- **Modificación con laponita/GA.** Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente y se colocó dicho electrodo mo-

dificado con laponita en un recipiente cerrado saturado con vapor de glutaraldehído durante 30 minutos. Aunque el glutaraldehído se utiliza como agente entrecruzante con el que las enzimas establecen enlaces covalentes intermoleculares entre los grupos del soporte y del propio enzima, o intramoleculares entre dos grupos amino de la misma molécula de enzima, parece ser que éste se adsorbe sobre la superficie de la laponita o se retiene entre la estructura laminar de la misma.

3. RESULTADOS

3.1. Electrodo de carbón vítreo

La Figura 1 muestra el voltamperograma obtenido con una disolución tampón fosfato 0,1 M pH 6,0 en ausencia y presencia de DA 5×10^{-4} M en un electrodo de carbón vítreo al realizar un barrido cíclico entre $-0,2$ V hasta $0,6$ V vs. Ag/AgCl (3 M). El voltamperograma representado con líneas discontinuas corresponde a la respuesta electroquímica del sensor químico en una disolución tampón fosfato, y

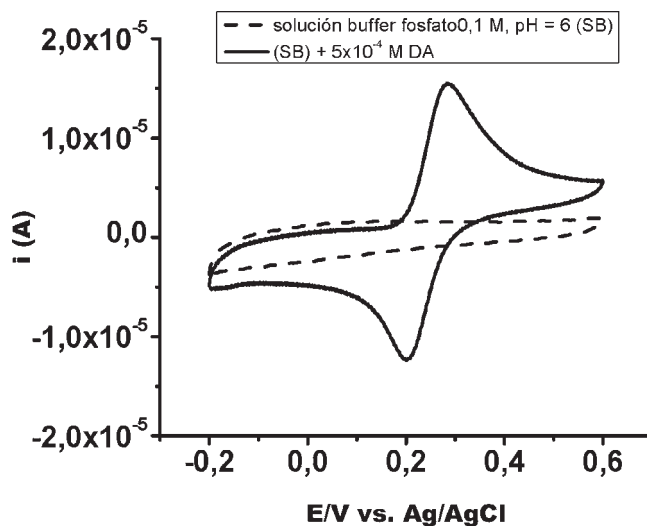


Figura 1. Voltamperograma cíclico de la DA en un electrodo de carbón vítreo ($d = 3$ mm) en una disolución tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0; $v = 200$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

el presentado con línea continua a la respuesta electroquímica del sensor químico en la disolución 5×10^{-4} M DA.

El voltamperograma obtenido en presencia de DA presenta los picos de oxidación y reducción de la dopamina con un ΔE_p de 80 mV y una relación entre la corriente de pico anódica y catódica (I_{pa}/I_{pc}) de 1,2, al realizar los ciclos a $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.2. Electrodo de carbón vítreo modificado con laponita y laponita/glutaraldehído

En la Figura 2 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos en disoluciones de distintos pHs en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita, y en la Figura 3 se observa el efecto de la velocidad de barrido a los distintos pHs. Para realizar este estudio se disolvió DA en disoluciones tampón Tris/fosfato 0,1 M y pHs 5,98; 7,98; 8,98 y 11,03. Se observa que a pH 5,98 los potenciales catódicos disminuyen con la velocidad mientras que los anódicos aumentan, esta tendencia no se observa en el resto de pHs, donde los potenciales de pico apenas sufren cambios con las velocidades de barrido. Estos resultados también apuntan a que el proceso redox de la DA en el electrodo de carbón vítreo a pH 5,98 es menos reversible que a pHs más alcalinos. Como era de esperar, las corrientes

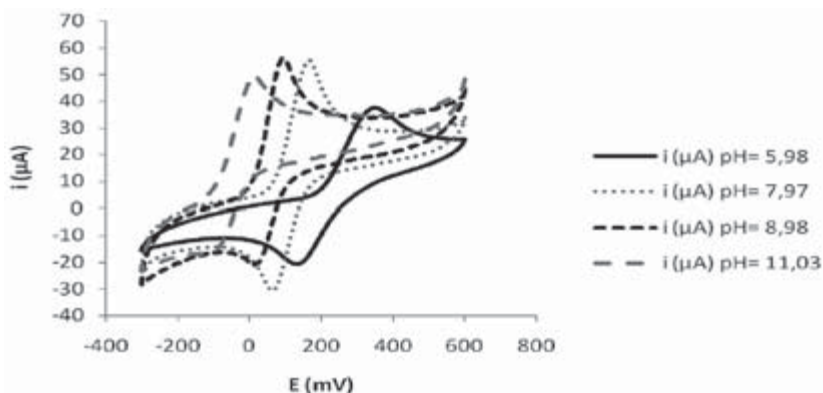


Figura 2. Voltamperogramas cíclicos de DA 510^{-4} M en una disolución tampón Tris/fosfato 0,1 M a diferentes pHs, en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita; $v = 500 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

anódica y catódica aumentan con la velocidad de barrido. Conviene destacar que en los voltamogramas realizados a $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ se observa una corriente catódica muy débil.

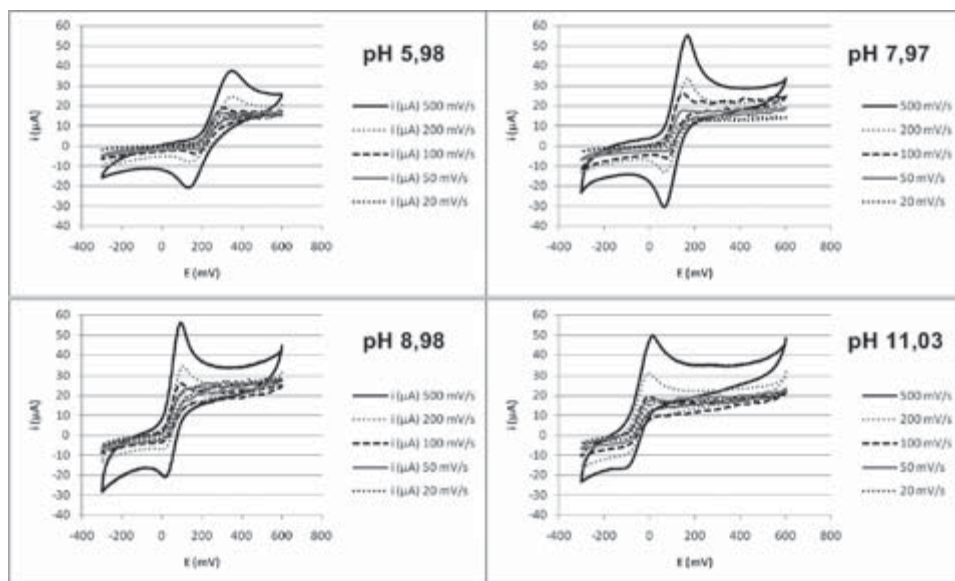


Figura 3. Voltamperogramas cíclicos de DA 510^{-4} M en una disolución tampón Tris/fosfato $0,1 \text{ M}$ a diferentes velocidades de barrido, en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita.

Al modificar el electrodo de carbón vítreo con una película de laponita, la respuesta electroquímica varía. El pico correspondiente a la oxidación de la DA se ve incrementado con respecto al obtenido sobre el electrodo sin modificar (Figura 4).

Como muestra la Figura 5, el pico de oxidación de la DA aumenta cuando el electrodo de carbón vítreo se modifica con laponita/GA, según el procedimiento ya descrito. Asimismo, se observa que la naturaleza de la capa que rodea al electrodo afecta a la reversibilidad del proceso electroquímico, siendo más irreversible cuando la capa aumenta su complejidad, primero laponita y posteriormente laponita/GA.

En vista de estos resultados se estudió el comportamiento electroquímico de la DA en presencia de la enzima tirosinasa en una disolu-

ción tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0 utilizando como sensor electroquímico el electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/GA.

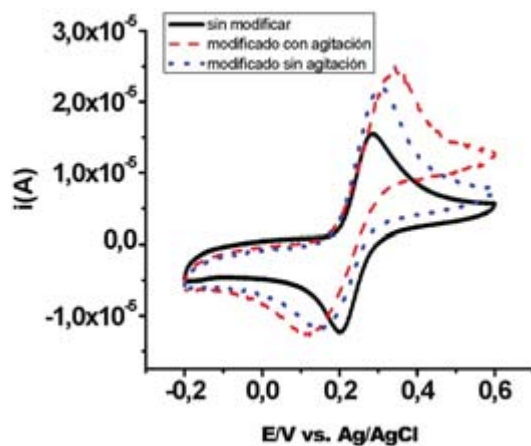


Figura 4. Voltamperogramas obtenidos en una disolución 5×10^{-4} M DA en tampón fosfato pH 6,0 utilizando un electrodo de carbón vítreo sin modificar y modificado con laponita; $v = 200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

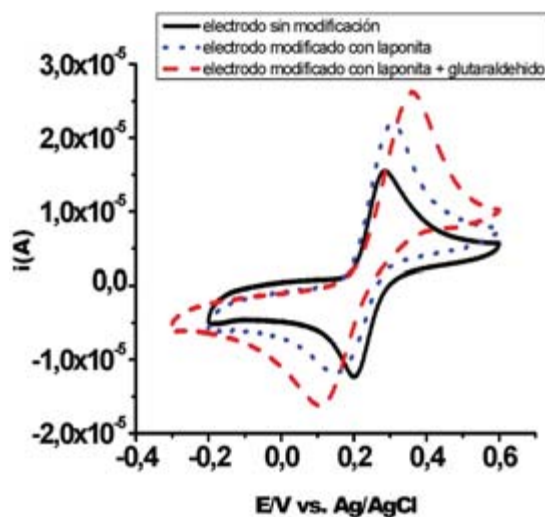


Figura 5. Voltamperogramas obtenidos en una disolución 5×10^{-4} M DA en tampón fosfato pH 6,0 utilizando un electrodo de carbón vítreo sin modificar y modificado con laponita y modificado con laponita/GA; $v = 200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

En la Figura 6 se observan cuatro picos (A, B, C y D). El pico A, que aparece a + 0,37 V; el pico B a + 0,1 V; el pico C a -0,25 V y el pico D a -0,1 V. A medida que transcurre el tiempo de mezcla de la tirosinasa y DA en la disolución tampón fosfato pH 6,0 la disolución comienza a colorearse al mismo tiempo que los picos A y B disminuyen y otros picos aparecen y aumentan con el tiempo de mezcla (picos C y D). Una vez que la DA se ha consumido completamente como consecuencia de la reacción enzimática con la tirosinasa, los picos C y D permanecen constantes en el tiempo, lo cual es indicativo de que durante dicho proceso la superficie electródica no se desactiva.

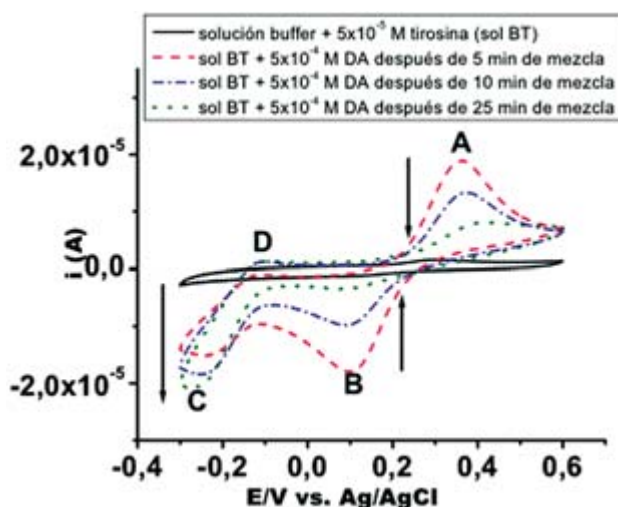


Figura 6. Voltamperogramas obtenidos a lo largo del tiempo, en una disolución 5×10^{-4} M DA y 5×10^{-5} M tirosinasa en tampón fosfato pH 6,0 en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/GA; $v = 200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

En la Figura 7 se observa que al hacerse más catódico el potencial de retorno, el pico C permanece constante mientras que se aprecia un aumento del pico D, como consecuencia de que una mayor cantidad de dopaminocromo está siendo reducido. Por otra parte, comienza a desarrollarse un nuevo pico de oxidación, pico (E) a 0,2 V, posiblemente debido a la oxidación de un nuevo producto que se origina al reaccionar el leucodopaminocromo con la DAQ a medida que el potencial catódico se va haciendo más negativo, hasta -0,45 V, como sugieren otros autores (14).

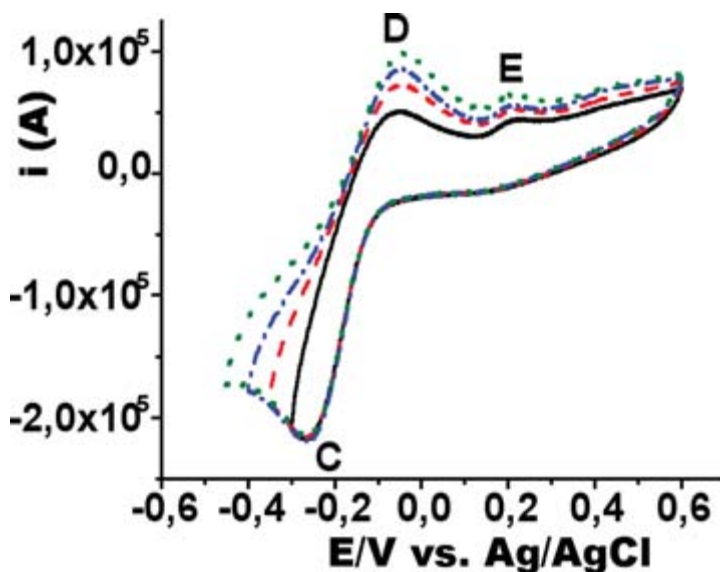


Figura 7. Voltamperogramas obtenidos en una disolución 5×10^{-4} M DA y 5×10^{-5} M tirosinasa en tampón fosfato pH 6,0 una vez completada la reacción enzimática y al ir variando el potencial de retorno, en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/GA; $v = 200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Se observa además que a potenciales más negativos de $-0,45 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl los picos C y D disminuyen y la disolución se torna mucho más oscura, lo cual puede indicar que a dichos potenciales la superficie electródica comienza a desactivarse posiblemente debido a la adsorción de un material polimérico que se origina por la formación del tautómero p-quinonamina-dopaminocromo, a potenciales más negativos de $-0,45 \text{ V}$, el cual induce al proceso de polimerización (14).

El hecho de que una vez que la DA presente en la disolución ha reaccionado completamente a través de la reacción enzimática con la tirosinasa, el pico C permanezca constante al realizar ciclos entre $0,6 \text{ V}$ y $-0,45 \text{ V}$, nos permite pensar en la posibilidad de construir un sensor enzimático para la cuantificación indirecta de DA a través de la medida de la corriente que se origina al reducirse electroquímicamente el dopaminocromo que se forma por la reacción enzimática entre la DA y la tirosinasa.

La Figura 8 muestra la relación lineal existente entre la corriente de reducción del producto formado en la reacción enzimática y la concentración de DA presente en la muestra, en presencia de tirosinasa.

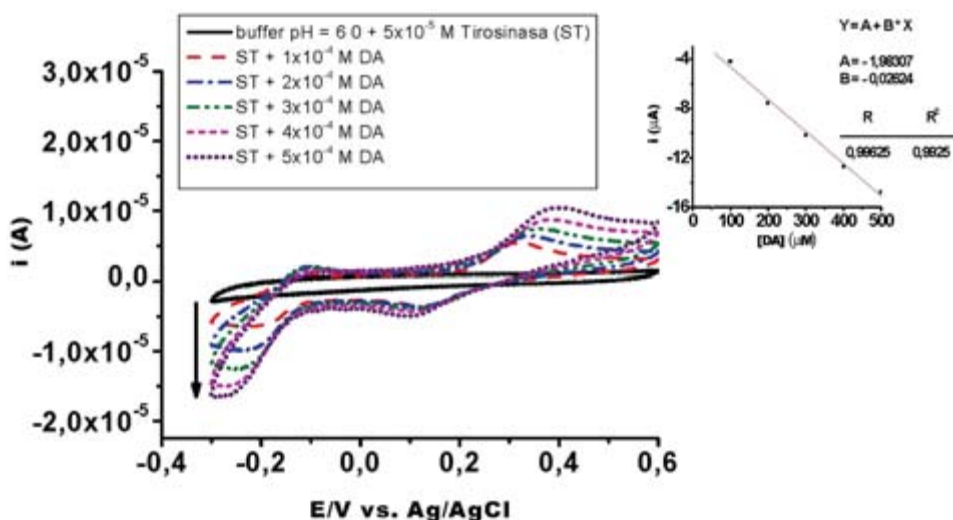
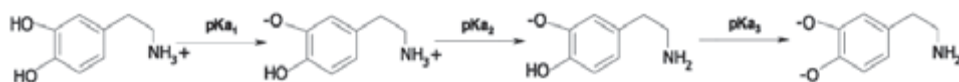


Figura 8. A) Voltamperogramas obtenidos en una disolución de tirosinasa 5×10^{-5} M en tampón fosfato pH 6,0 al añadir cantidades crecientes de DA y registrados 25 minutos después de cada adición, manteniendo dicha disolución en agitación, en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/GA; $E = -0,25$ V vs. $Ag/AgCl$ (3M); $v = 200$ $mV \cdot s^{-1}$. B) Relación lineal entre la corriente de reducción del dopaminocromo formado tras la reacción enzimática y la concentración de DA.

4. DISCUSIÓN

Al estudiar el comportamiento electroódico de la DA en función del pH tenemos en cuenta los equilibrios de disociación de la molécula (Esquema 1) y la fracción molar de cada una de las especies presentes en disolución a distintos pHs (Figura 9).



Esquema 1. Equilibrios de disociación de la dopamina.

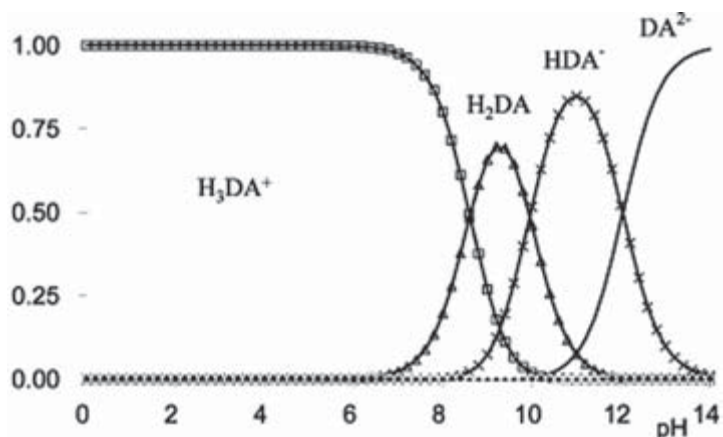
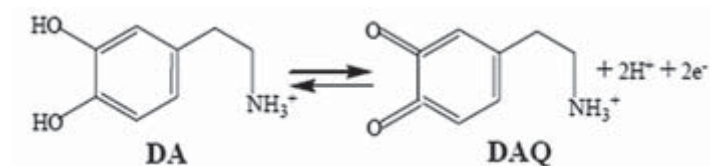


Figura 9. Fracciones molares de las distintas especies de dopamina en función del pH del medio.

El descenso observado en los potenciales de pico de la pareja DA/DA_{OXIDADA} al aumentar el pH de 6,0 a 11,0 se debe a la generación de iones hidrógeno en la reacción de oxidación de la DA (Esquema 2). Por ello, un aumento en el pH de la disolución favorece la oxidación de la DA y como consecuencia, los potenciales disminuyen.



Esquema 2. Mecanismo de oxidación de la dopamina.

Por otra parte, la carga neta de la molécula provoca cambios en su comportamiento electroquímico. Al realizar los barridos a $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, cuando la DA presenta una carga neta positiva (pH 5,98) el ΔE_p es 210 mV, sin embargo ΔE_p se reduce a la mitad, 102 mV, a pH 7,97 y alcanza un valor de 66 mV a pH 8,98. El pico de reducción desaparece a pHs muy alcalinos (11,03). Estos resultados indican que el mecanismo redox de la especie de DA neutra es más reversible

que el de las especies cargadas, probablemente debido al entorno de carga positiva (laponita), que rodea a la superficie electrónica, que dificulta la difusión de la DA cargada a través de la arcilla, en su camino hacia el electrodo.

Si tenemos en cuenta los pKas de la DA (9,0; 10,6 y 12,1) (10) al pH de trabajo (pH 6,0), la molécula tiene carga positiva y, por tanto, será fácilmente retenida por la laponita en las proximidades del electrodo, aumentando considerablemente la concentración de DA en la interfase electrodo/disolución lo que da lugar al aumento de corriente observado. Se ve además que, al agitar la disolución, el transporte de masa por convección de la DA hacia la superficie del electrodo modificado está favorecido ya que la corriente de oxidación incrementa mientras que la señal de reducción de la especie oxidada de la DA se mantiene prácticamente constante.

El proceso electroquímico que sufre la DA se hace menos reversible sobre la superficie del electrodo modificado con laponita con respecto a la respuesta observada sobre el electrodo sin modificar.

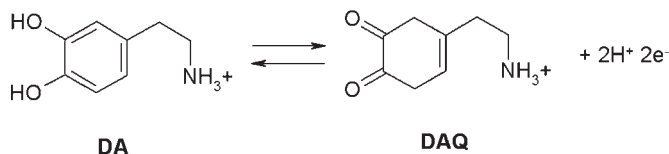
En el electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/GA se observa un aumento de la señal y una mayor separación entre los picos. Este comportamiento sugiere que las moléculas de GA se quedan adsorbida a la laponita y su reactividad con las aminas hace que algunas de las moléculas de DA que llegan a esa capa se unan al GA adsorbido en la laponita. Por ello el nivel de DA en la interfase electrodo disolución se ve aumentado debido a la suma de dos efectos, el intercambio catiónico con la laponita y la unión al GA, siendo ésta la razón del aumento de las corrientes tanto anódica como catiónica.

Los cuatro picos que aparecen en el voltamograma de una disolución de DA en presencia de tirosinasa a pH 6,0 se corresponden con la oxidación electroquímica de la DA (Pico A), la reducción de la dopaminoquinona (DAQ) (Pico B), la reducción del dopaminocromo (Pico C) y la oxidación del leucodopaminocromo (Pico D).

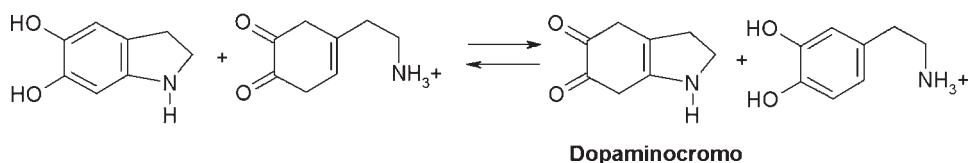
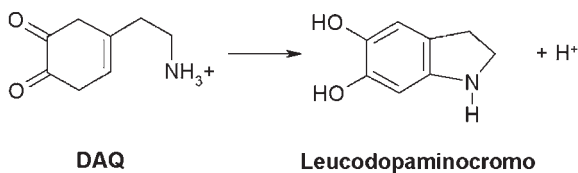
Los picos de oxidación y reducción de la DA y sus metabolitos ya han sido descritos en la literatura utilizando un electrodo de pasta de carbón modificado enzimáticamente (11), un electrodo de carbón vítreo empleando espectroelectroquímica FTIR *in-situ* (12), un elec-

trodo de oro modificado enzimáticamente, donde la enzima glucosa oxidasa fue codepositada electroquímicamente dentro de un polímero conductor (13) y un electrodo de carbón vítreo modificado con una mezcla de un gel líquido y nanotubos de carbón (14), entre otros.

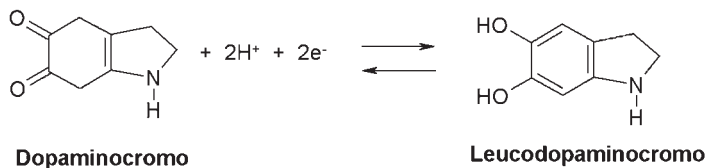
Oxidación electroquímica y enzimática de la DA



Reacciones químicas de la DA y DAQ



Reducción electroquímica del dopaminocromo



Esquema 3. Procesos electroquímico y enzimático de la dopamina en la celda electroquímica.

Según los resultados expuestos, se confirma que el uso de un electrodo de carbón vítreo modificado físicamente por adsorción

sobre su superficie con una matriz laponita/GA puede utilizarse como sensor electroquímico para la detección indirecta de DA midiendo la corriente catalítica originada por la reducción del dopaminocromo en la reacción enzimática de DA con tirosinasa tal como se muestra en el Esquema 3, ya que se ha comprobado la linealidad existente entre la corriente de reducción medida en estas condiciones y la concentración de DA presente en la muestra.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Complutense por la financiación de este trabajo a través del CCG07-UCM/MAT-2681 (Gp 950247) Programa para la Consolidación de grupos de investigación, España, y al CDCHT-ULA (FA-430-08-08-B) y FONACIT Venezuela.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, R. N. & Justice, J. B. Jr., Editors (1987) «Voltammetry in the Neurosciences: Principles Methods and Applications». The Humana Press, Clifton, NJ.
2. Stamford, J. A. & Justice, B. Jr. (1996) Probing brain chemistry. *Anal. Chem.* 69: 359A-363A.
3. Zhao, H., Zhang, Y. & Yuan, Z. (2002) Determination of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid Using Poly (hippuric acid) Modified Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*. 14: 1031-1034.
4. Ciszewski, A. & Milczarek, G. (1999) Polyengamol-modified platinum electrode for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid. *Anal. Chem.* 71: 1055-1061.
5. Duong, B., Arechavaleta, R. & Tao, N. J. (1998) *In situ* AFM/STM characterization of porphyrin electrode films for electrochemical detection of neurotransmitters. *J. Electroanal. Chem.* 447: 63-69.
6. Fragoso, A., Almirall, E., Cao, R., Echegoyen, L. & González, R. (2004) A supramolecular approach to the selective detection of dopamine in the presence of ascorbate. *Chem. Comm.* 19: 2230-2231.
7. Raj, C. R., Tozuda, K. & Osaka, T. (2001) Electroanalytical applications of cationic self-assembled monolayers: square-wave voltammetric determination of dopamine and ascorbate. *Bioelectrochem.* 53: 183-191.
8. Menolasina, S., Contreras, R. R., Aguilar A., Contreras O. & Rodríguez A. (2007) Comportamiento electroquímico de la Dopamina en presencia de ácido ascórbico utilizando un electrodo de oro modificado electroquímicamente y

- un electrodo de oro modificado electroquímicamente y químicamente con un tiol. *Revista Técnica de la Universidad del Zulia*. 30: 151-156.
9. Mousty, C., Cosnier, S., Sánchez-Paniagua López, M., López-Cabarcos, E. & López-Ruiz, B. (2007) Rutin Determination at an Amperometric Biosensor. *Electroanalysis*. 19: 253-258.
 10. Sánchez-Rivera, A. E., Corona-Avendaño, S., Alarcón-Angeles, G., Rojas-Hernández, A., Ramírez-Silva, M. T. & Romero-Romo, M. A. (2003) *Espectrochim. Acta*. 59: 3193-3203.
 11. Forzani, G. A., Rivas, G. A., Solís, V. M. (1997) Amperometric determination of dopamine on vegetal-tissue enzymatic electrodes. Analysis of interferents and enzymatic selectivity. *J. Electroanal. Chem.* 435: 77-84.
 12. Wang, X., Jin, B. & Lin, X. (2002) *In-situ* FTIR Spectroelectrochemical study of dopamine at a glass carbon electrode in a neutral solution. *Anal. Sci.* 18: 931-933.
 13. Li, M., Deng, C., Xie, Q., Yang, Y. & Yao S. (2006) Electrochemical quartz crystal impedance study on immobilization of glucose oxidase in a polymer grown from dopamine oxidation at an Au electrode for glucose sensing. *Electrochim. Acta*. 51: 5478-5486.
 14. Zhao, Y., Gao, Y., Zhan, D., Liu, H., Zhao, Q., Kou, Y., Shao, Y., Li, M., Zhuang, Q. & Zhu, Z. (2005) Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid by a carbon nanotubes-ionic liquid gel modified electrode. *Talanta*. 66: 51-57.

*** Información de contacto:**

Doctora Beatriz López-Ruiz.

Sección Departamental de Química Analítica.

Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Avda. Complutense, s/n. 28040, Madrid.

Email: bealopru@quim.ucm.es

SESIÓN NECROLÓGICA

Addendum a la Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Gregorio Varela Mosquera

Sesión celebrada el 8 de mayo de 2008 y publicada en el número 1 de 2009.

Gregorio Varela Mosquera. El Investigador

Bernabé Sanz Pérez

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Excma. Señora Presidenta,
Excmas. Señoras y Señores Académicos,
Queridos Olga, Gregorio y Julia,
Señoras y Señores.

Agradezco muy cordialmente a la Excma. Señora Presidenta de esta Real Academia y a la Junta de Gobierno el encargo de organizar esta Sesión Necrológica en honor de quien fue uno de sus más preclaros Académicos, el Profesor don Gregorio Varela Mosquera.

Cuanto participamos en este póstumo homenaje somos conscientes de la imposibilidad de condensar en una sola sesión la intensa, fructífera y dilatada labor docente, científica y académica de quien fue nuestro amigo y compañero. Sin embargo, sí pretendemos mostrarles, de forma resumida, su magisterio forjador de vocaciones. A su lado se formaron muchas promociones de farmacéuticos y veterinarios y un número no pequeño de profesores universitarios e investigadores. Muchos de sus alumnos de posgrado y de cursos de

especialización que participaron activamente en el quehacer diario del departamento, pronto se convertirían (valga la expresión) en entusiastas e hiperactivos especialistas de su profesión. Los profundos conocimientos de las ciencias nutritivas del maestro Varela, sus notables habilidades prácticas y la incorporación de nuevas técnicas a su quehacer diario, les servían a los estudiantes de estímulo para su trabajo cotidiano y para que disfrutaran en los laboratorios «cacharreando» y manejando ratas y ratones.

La actividad investigadora del Profesor Varela Mosquera se inicia en 1942, recién terminada su licenciatura en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Sus primeros tres lustros de investigación transcurrieron en la Facultad de Farmacia de la U.C.M. (donde fue nombrado Ayudante de clases prácticas), en la Facultad de Veterinaria (participando como colaborador honorario en el quehacer investigador de las cátedras de Farmacología y de Fisiología), en la Sección de Fisiozootecnia del Patronato de Biología Animal y en el C.S.I.C., donde fue primero becario y pasando por todos los niveles llegó a director del Departamento de Nutrición del Patronato «Juan de la Cierva» y más tarde Jefe de la Estación Experimental del Zaidín (Granada).

Pero comencemos por el principio.

Al conseguir su primera beca de iniciación a la investigación, trabajó bajo la dirección del Excmo. Señor don Ramón Portillo Moya-Angeler, que fue Catedrático de Técnica Física de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid, Jefe del Departamento de Química-Física Biológica del C.S.I.C. y Académico de esta Institución con la medalla 24. Como hace constar el Doctor Varela en su Discurso de Ingreso como Académico de Número de esta Real Academia, a su lado se familiarizó con la química-física y con las técnicas analíticas e instrumentales que tanto le servirían en sus investigaciones ulteriores y, asimismo, para emplearlas en la realización de su tesis doctoral titulada «*Algunas aplicaciones del método polarográfico en la determinación de aldehídos y cetonas y su aplicación en Farmacia*», que fue dirigida por el Profesor Portillo, obtuvo la calificación de sobresaliente *cum laude* y más tarde el Premio Extraordinario de Doctorado. Un comienzo que no puede ser más prometedor.

Sus primeras publicaciones, de carácter eminentemente analítico-instrumental, se refieren al empleo de la fluorescencia, densitometría, polarografía y otras técnicas instrumentales en la determinación de alcaloides del cornezuelo del centeno, de las proteínas sanguíneas, de los productos de oxidación de la adrenalina y en la valoración de algunas vitaminas. En muchas de estas publicaciones figura también como coautor el Profesor Portillo.

Desde 1944 y hasta que se marchó a Granada en 1957, Varela participó en la Facultad de Veterinaria y en el Patronato de Biología Animal de Madrid en las investigaciones que dirigían dos prestigiosos profesores, Félix Sanz Sánchez y José Morros Sardá, Catedráticos de Farmacología y Fisiología, respectivamente, de dicha Facultad. Los dos fueron Académicos del Instituto de España. El primero de la Real Academia Nacional de Medicina con la medalla 32, y Morros de las de Farmacia, medalla 11 y de Medicina, medalla 12. De estas colaboraciones surgieron más de treinta artículos sobre diversos aspectos fisiológicos, farmacológicos y bioquímicos, publicados en algunas de las entonces más prestigiosas revistas españolas de la especialidad: *Anales de la Academia de Farmacia de Madrid*, *Archivos del Instituto de Farmacología Experimental*, *Avances en Alimentación Animal*, *Anales de Bromatología*, *Revista de Nutrición Animal* y la francesa *Archives Internationaux de Pharmacodynamie et Thérapie*. Son una prueba fehaciente del empeño y bien hacer de Varela y de sus compañeros en aquellos años de penuria y falta de medios en los laboratorios de investigación españoles.

Parece casi imposible que un recién licenciado, como era Gregorio, además de cumplir con sus obligaciones en la Facultad de Farmacia (ayudante y luego profesor interino), en el C.S.I.C. (becario) y de trabajar en su tesis doctoral de Farmacia, todavía tuviese arresos para colaborar, *gratis et amore*, en la Facultad de Veterinaria y en la sección de Fisiozootecnia del Patronato de Biología Animal. Y es que una de sus peculiaridades como investigador sería siempre su capacidad de simultanear diversos temas, lo que le permitió en algunas ocasiones publicar en el mismo año varios artículos en las mejores revistas de fisiología y nutrición.

En 1952 el joven Varela consigue una beca de estudios del C.S.I.C. para la llamada entonces República Federal de Alemania, en cuyo

Instituto de Nutrición Animal de Braunschweig-Völkemrode y bajo la dirección del profesor Richter y de la Doctora Schiller aprendió las técnicas experimentales de la moderna nutrición animal. En este instituto, años después también ampliaron sus estudios dos de nuestros queridos compañeros, los doctores don Manuel Ruiz Amil y don Albino García Sacristán.

Este instituto, situado a unos 80 kilómetros al norte de Hannover, en la Baja Sajonia, gozaba ya en 1950 de merecida fama por la calidad de sus publicaciones sobre nutrición animal (básica y aplicada), por el prestigio de quien formaba parte de sus departamentos y por la disposición racional de sus instalaciones y campos de investigación, en donde contaban con todo tipo de facilidades para trabajar en las mejores condiciones, tanto con animales de experimentación como con los de renta. De aquí pasaría a la Escuela Superior de Veterinaria de Hannover donde, bajo la supervisión del profesor Völker, cursa las materias requeridas para obtener el título de Doctor en Medicina Veterinaria y realiza su tesis doctoral correspondiente titulada «*Über den einfluss stark Wirkender Analgetika auf die Peristaltik des Meerschweinchendarme in der Versuchsanordnung nach Straub*». Su estancia en Alemania la completó en el Instituto Federal de Zootecnia de Pequeños Animales, en la ciudad de Celle, donde disponían de modernas y excelentes estructuras, equipos y utillaje para la investigación y la explotación industrial de aves, conejos y otras especies de animales pequeños, como chinchillas y visones. Allí colaboró eficazmente con el Doctor Rauch y la Doctora Rahbaum. Además de la tesis, en el *Monatsheften für Veterinarmedizin* publicó, con sus colegas alemanes, un trabajo sobre Farmacología de los centros vegetativos, que fue muy bien acogido en la República Federal, lo mismo que lo fue en España, años después, el aparecido en los *Anales de Bromatología*, 7 (1995) sobre el comportamiento, a la luz UV, de las ovoproteínas de huevos de gallina frescos y almacenados.

Sus investigaciones, conocidas y apreciadas tanto en España como en el extranjero, fueron determinantes para que a su regreso a la patria, y a propuesta de otro gran académico de esta casa, el profesor don Román Casares López, se le nombrase en 1954 Jefe de Investigaciones de la recién creada Escuela de Bromatología de la Universidad de Madrid y para que se reincorporase al equipo de

investigación del profesor don Félix Sanz Sánchez de la Facultad de Veterinaria, algunos de cuyos colaboradores trabajaban ya como investigadores en el Centro del Frío (hoy Instituto) del C.S.I.C.

Don Félix Sanz Sánchez, en su época de auxiliar en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, trabajaba a diario con el profesor don Benito Lorenzo Velázquez, Catedrático de Farmacología de la Facultad de Medicina de aquella Universidad, que en 1941 obtuvo, por concurso de traslado, la misma plaza en la Facultad de Medicina de Madrid. Don Félix Sanz se trasladó también a esta ciudad para continuar colaborando con quien siempre consideró su maestro. Como escribe nuestro compañero Albino García Sacristán, fue uno de los fundadores en 1952 de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, cuya primera Junta presidió el profesor don José María de Corral Saleta y de la que el profesor Sanz fue Tesorero, ocupando años más tarde la Presidencia de esta prestigiosa Sociedad.

La labor investigadora del Doctor Varela fue intensa y fructífera durante los años 1954 a 1957, estudiando la acción de algunos fármacos activos en la función renal y sus efectos en los niveles de fosfomonoesterasas renales, la farmacodinamia de los ésteres fenilfosforosos y fenilfosfóricos, el valor nutritivo y digestibilidad de diversos pescados, la actividad rodanásica de la carne conservada por el frío, los procesos bioquímicos de la descomposición del pescado, lo que permitió sacar a la luz una docena de publicaciones en las mejores revistas españolas de la época y presentar una serie de comunicaciones en congresos nacionales e internacionales.

En 1956 da un giro a sus objetivos investigadores y sin abandonar su demostrado interés por la Fisiología Animal, continúa profundizando en la digestibilidad de legumbres, pescados y embutidos españoles, y se implica cada vez más en las encuestas de alimentación de distintas regiones y ciudades españolas y en la conservación por el frío de alimentos pereceros. Su interés por la alimentación de poblaciones le lleva, en el verano de 1956, a la División de Nutrición de la F.A.O. en Roma, analizando con el Profesor Rao los muchos problemas que deben superarse para suministrar y distribuir, en cantidad suficiente, los alimentos requeridos por las zonas más deprimidas del mundo.

Durante muchos años dirigió y supervisó en la Escuela de Bromatología de la Universidad Complutense de Madrid las muchas encuestas alimentarias que realizaban los alumnos del último curso. Ello le permitió ser, sin ningún género de dudas, el científico mejor informado del consumo alimentario en España. En dicha Escuela, como escribió el profesor Román Casares, que fue su fundador y primer director, «encontró una eficaz colaboración en Olga Moreiras Tuni, quien no sólo le ayudó en su trabajo sino que además compartiría con él su futuro. Tan identificados estuvieron siempre, añade el maestro Casares, que resultaba difícil muchas veces saber quién colaboraba con quién».

De ese período son algunos de sus múltiples estudios sobre la alimentación de las principales comarcas, regiones y ciudades españolas, entre ellos:

- Encuesta alimentaria piloto de Madrid.
- Estudio por hojas de balance de la alimentación de la población de Madrid.
- Avance analítico de la Encuesta Nacional de Alimentación.
- Niveles de nutrición en diferentes regiones y estratos sociales.
- Estudio de la nutrición del estudiante universitario de Granada.
- Diagnóstico del estado nutritivo de la población española.

Su interés por los alimentos perecederos de origen animal lo reflejan, igualmente, algunos trabajos como:

- Conservación por el frío de algunos pescados de los gádidos.
- Conservación por el frío de la carne.
- Hielo antibiótico en la conservación de productos pesqueros.
- Valor nutritivo de las proteínas de la merluza.
- Procesos bioquímicos en la descomposición del pescado.
- Y su tesis doctoral en Veterinaria titulada «*Influencia de la técnica del frío en la conservación y valor nutritivo del pescado*» (1959).

En 1957 obtiene por oposición la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Farmacia de Granada y meses más tarde se encarga de la dirección de la Sección de Fisiología Animal de la Estación Experimental del Zaidín (Granada). Tanto en la Facultad como en la Estación Experimental se rodeó muy pronto de excelentes colaboradores entusiastas, entre los que figuraban Julio Boza, Gómez Guillamón, Juan Fonollá, Aurelio Morillo y posteriormente Salvador Zamora, Manuel de la Higuera, Alejandro Esteller y muchos más, cuyos artículos se publican en las revistas más importantes de Nutrición y Fisiología y cuyas comunicaciones y ponencias figuran en las Actas y *Proceedings* de los congresos más valorados de esta época.

Otro campo en el que Valera fue pionero en España es el de los aceites y grasas de fritura. Fue el primero en estudiar la palatabilidad y valor nutritivo del aceite de oliva de diferentes regiones productoras españolas. Después trabajó en la estabilidad del elaborado por distintos procesos de prensado y extracción, en el almacenado bajo distintas condiciones de temperatura, humedad y luminosidad. Luego prestó atención también a sus procesos de degradación durante las frituras repetidas, a la formación de productos tóxicos, a los efectos en la digestibilidad alimentaria, etc. Lo inició recién llegado a la Cátedra de Fisiología Animal de Granada y lo continuó durante más de dos décadas, hasta después de su traslado a Madrid. Para ello contó con colaboradores como Pujol, Morerías, Mateu, Monteoliva, Ruiz Moso, Mataix, Casado, Sánchez Muniz y una larga lista de colaboradores. Los resultados de sus investigaciones aparecieron con gran frecuencia y regularidad en revistas como *Anales de Bromatología*, *Proceedings of the British Nutrition Society*, *Revista Española de Fisiología*, *Proceedings of the International Union of Physiological Sciences*, etc.

Bajo la dirección del Profesor Varela la producción científica de la Estación Experimental del Zaidín en nutrición básica y aplicada (principalmente animal, pero también humana) alcanzó cifras que inicialmente parecían imposibles. Sin embargo, nuestro académico, dado que era un gran maestro, sabía contagiar a sus doctorandos, becarios y colaboradores de su entusiasmo por la investigación, lo que se manifestaba en los muchos experimentos en marcha, en los resultados obtenidos y, en consecuencia, en la gran calidad de sus artículos, ponencias y comunicaciones a congresos, mesas redondas

y otros foros donde dejaban el sello indeleble del Zaidín. He aquí algunas de sus líneas de investigación, sin pretender citar todas:

- Digestibilidad y valor nutritivo de los piensos corrientes (cebada, avena, veza y almortas) y de los de recurso (salvado de arroz, harina de higo chumbo, proteína unicelular de *Hansenula anomala* y subproductos de pimentón) tanto en rumiantes (ovejas y cabras), como monogástricos (cerdos y pollos).
- El comportamiento metabólico del conejo y la codorniz (*Coturnix japonica*) bajo diferentes condiciones de explotación e influencia de los factores ambientales.
- Efectos de la incorporación del molibdeno al pienso de rumiantes en la digestibilidad y valor nutritivo de sus raciones con urea.
- Tecnología de piensos: Acciones de los agentes aglutinantes y de la granulación del pienso en su dureza, digestibilidad y valor nutritivo.
- Fisiología del estrés alimentario.
- Efectos de la incorporación de grasa de fritura, utilizada repetidamente, al pienso de los animales de abasto y sus efectos en la digestibilidad y valor nutritivo de la ración.

Después de tres lustros trabajando en la Facultad de Farmacia de Granada y en la Estación Experimental del Zaidín, en 1971, por concurso de traslado, fue nombrado Catedrático de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, ocupando de inmediato la Dirección del Departamento correspondiente, puesto que desempeñó hasta 1976.

El Profesor Varela se hizo cargo de esta cátedra pocos años después de inaugurada en la Ciudad Universitaria la recién construida Facultad de Veterinaria. Si bien disponía de terreno suficiente, el edificado era escaso y la facultad nació pequeña y sin capacidad bastante para atender a la demanda de plazas de sus estudiantes, que hubieron de sufrir la falta de espacio de sus aulas y laboratorios y la carencia de facilidades hospitalarias animales. Antes de terminar las obras pendientes del proyecto original ya se tuvieron que aprobar los anteproyectos del nuevo aulario y del Hospital Clínico

Veterinario. Todos estos inconvenientes no arredraron a nuestro académico que, superando las trabas burocráticas, consiguió en un tiempo récord que se construyesen «con carácter provisional», dos nuevos pabellones, uno que albergaba la parte administrativa de la cátedra, además de laboratorios y animalario experimental, y otro (de tabiques prefabricados) dedicado a establos para rumiantes.

También montó un laboratorio de Fisiología y Nutrición ictiológicas vinculado al C.S.I.C., donde llevó a cabo excelentes trabajos de nutrición con truchas y anguilas.

Sus líneas de trabajo, mientras estuvo en la Facultad de Veterinaria de la U.C.M., fueron:

- Digestibilidad, valor nutritivo y balance nitrogenado en cerdos alimentados con maíz rico en lisina.
- Influencia nutricional y hormonal en los niveles de ornitina transcarbamilasa hepática de rumiantes.
- Estudios de digestibilidad y rendimiento en bóvidos de raza «rubia gallega».
- Secreción endógena de nitrógeno en ratas.
- Concentrados proteicos de mejillón en alimentación animal.
- Metabolismo del calcio en aves de carne y de puesta.
- Utilización de piensos de alto contenido de caseína en la trucha.
- Aprovechamiento en piscifactorías de la proteína del pienso granulado con diferentes niveles de grasa.

En marzo de 1976 volvió, por concurso de traslado, a su Facultad de Farmacia de la U.C.M. donde había pasado su época de estudiante, de Licenciatura y de Doctorado, haciéndose cargo del Departamento de Fisiología Animal hasta 1985. Entonces, al reestructurarse en áreas de conocimiento las materias de los distintos planes de estudio de la Universidad española, pidió su incorporación al área de Nutrición y Bromatología, siendo nombrado Catedrático y después Director del Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la U.C.M., cargo en el que continuó hasta 1987, cuando pasó a ser profesor emérito de la misma asignatura.

El Profesor Varela, en su etapa de Catedrático de la Facultad de Farmacia de Madrid siguió profundizando en las líneas de investigación desarrolladas en Granada y en la Facultad de Veterinaria, y además incorporó otras nuevas como:

- Estado nutritivo, gastos y tendencias de consumo en zonas urbanas y rurales españolas.
- Efectos de las distintas fases de procesado en la calidad y valor nutritivo en las conservas de pescado.
- Establecimiento del estatus nutricional de los escolares de diferentes nivel socioeconómico por medida de los valores antropogénicos y sanguíneos.
- El concepto de dieta mediterránea y sus efectos en la salud.

Nuestro académico, que tanto interés y dedicación puso en su formación investigadora, procuró desde 1946 hacer todos los veranos estancias cortas de unos meses en diferentes centros del extranjero, donde cambiar impresiones en mutuo interés con sus colegas y donde familiarizarse con nuevas técnicas y metodologías que, a su regreso, ponía a punto y enseñaba a sus colaboradores. Permítanme Señora Presidenta, señoras y señores Académicos, que cite entre otros muchos departamentos visitados por nuestro compañero los siguientes: *Center for Experimental Physiology* de la Universidad de Cambridge, que dirigía el Profesor Adrian; el *Strangeways Research* de la misma universidad, donde trabajaba con el Doctor Jacobson; la *Hammersmith Postgraduate Medical School* de Londres, donde enseñaba el Doctor King, el renombrado *Rowett Research Institute* de Aberdeen (Escocia) y el *Brabham Institute for Animal Physiology*, dirigido por el Profesor Gaddum.

Gregorio siempre mantuvo una relación fraternal con quienes fueron sus maestros y luego también con sus doctorandos y colaboradores, sin que la distancia supusiese lejanía ni olvido. Por el contrario, siempre compartió con ellos día a día sus preocupaciones y hallazgos, y a sus alumnos los siguió orientando en sus trabajos, siendo frecuentes sus mutuas visitas.

En sus muchos años de actividad investigadora nuestro académico publicó 366 artículos en las más prestigiosas revistas de su espe-

cialidad, presentó más de 300 ponencias y presentaciones a congresos y jornadas científicas nacionales e internacionales y, además, dirigió 52 tesis doctorales, escribiendo 30 libros y monografías y 40 capítulos de libros. Ha sido, pues, durante mucho tiempo un protagonista y animador importante de la vida científica española.

Hoy, señoras y señores académicos, esta Academia rinde un cálido y sentido homenaje al Profesor Varela, cuyo optimismo, generosidad y fina ironía gallega, con las que narraba sus múltiples anécdotas, seguirán impregnando siempre los muros vetustos de esta casa.

La Real Academia Nacional de Farmacia ha perdido a un gran académico, la nutrición española a un gran científico y quienes hemos sido sus compañeros y amigos a una de las mejores y más animosas personas que hemos conocido. Por tanto, al manifestar la condolencia de todos cuantos formamos parte de esta Institución a Olga, su fiel esposa y colaboradora de vida, y a sus hijos Gregorio y Julia, con quienes tantos afanes compartió, pedimos al Señor, en quien tanto confió, que le haya dado la bienaventuranza eterna.

He dicho.

INFORMACIÓN ACADÉMICA

SESIONES CIENTÍFICAS

7 de mayo

Conferencia del Doctor Pedro Guillén García, Director y médico cirujano de la clínica Cemtro de Madrid y Catedrático de Traumatología del Deporte de la Universidad de Murcia sobre: «Tratamiento de los defectos condrales con injerto de cartílago autólogo».

14 de mayo

Mesa Redonda de la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales sobre el Balneario de Alicún de las Torres, en Granada. Ponentes: Doctora Doña Francisca Fernández Chacón: «Estudio hidrogeológico de las aguas del balneario»; Doctora Doña Carmen de la Rosa Jorge: «Estudio microbiológico de las aguas del balneario»; Doctora Doña Esperanza Torija Isasa: «Análisis físico-químico de las aguas del balneario», y Doctora Doña Josefina San Martín Bacaicoa: «Acción terapéutica de las aguas del balneario».

21 de mayo

Toma de Posesión como Académico Extranjero del Profesor Doctor Álvaro Pascual-Leone, Profesor de Neurología de la Facultad de Medicina de Harvard y Director del Centro Berenson-Allen para Estimulación Cerebral No-invasiva, que pronunció su conferencia titulada: «La modulación de redes neurales específicas en humanos». Fue presentado por el Excmo. Señor Don Guillermo Giménez Gallejo, Académico de Número.

28 de mayo

Conferencia del Excmo. Señor Don Federico Mayor Zaragoza, Académico de Número sobre: «Agua, fuente de vida».

4 de junio

Tertulia científica sobre «Bases científicas de la diferenciación sexual. Reflexiones». Actuó como ponente la Excma. Señora Doña Ana María Pascual-Leone Pascual, Académica de Número de la RANF.

Conferencia del Profesor Doctor Leonardo Colapinto, Profesor de Historia de la Farmacia en la Facultad de Farmacia de la Universidad La Sapienza de Roma, sobre «La vida y la obra de Carlo Erba, pionero de la industria farmacéutica italiana».

9 de junio

Conferencia del Excmo. Señor Don José Antonio Cabezas Fernández del Campo, Académico de Número, sobre la Nueva gripe A/H1N1.

25 de junio

Presentación de la Monografía titulada: «Células madre y terapia regenerativa». Intervinieron la Excma. Señora Doña María Cascales Angosto, Académica de Número de la RANF, y la Doctora Flora de Pablo Dávila, Académica Correspondiente de la RANF.

NOTICIAS

El Excmo. Señor Don Benito del Castillo García, Académico de Número de esta Corporación, ha sido investido el 10 de mayo Doctor «Honoris Causa» por la Universidad de Coimbra. Esta Universidad es una institución portuguesa de enseñanza superior situada en la ciudad de Coimbra. Su antecedente inmediato es el Estudo Geral fundado en 1290 en Lisboa y transferido a Coimbra en 1308 por el rey Dionisio (Dinis) el Labrador, sólo un siglo más tarde de la fundación de la nación portuguesa. Hoy en día, la Universidad de Coimbra cuenta con ocho facultades (Letras, Derecho, Ciencias y Economía, Psicología y Ciencias de la Educación, Ciencias del Deporte y Educación Física) y cerca de 22.000 alumnos. El Doctor del Castillo es Decano Honorario de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y Catedrático de Técnicas Instrumentales.

* * *

El Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada nombrado hijo predilecto de Burgos. El Ayuntamiento de Burgos ha entregado el 16 de mayo a su viuda el título de «Hijo Predilecto», a modo póstumo, a Juan Manuel Reol Tejada, nacido en esta ciudad en 1933 y fallecido en Madrid en 2008 y que fue el primer Presidente del Consejo General de Castilla y León y Presidente de Honor de la Real Academia Nacional de Farmacia. El alcalde de la ciudad, Juan Carlos Aparicio, ha destacado su aportación a la democracia en un momento de transición muy complicado y a la historia de Castilla y León.

* * *

La Sociedad Alemana de Historia de la Farmacia celebró el 2 de mayo de 2009 un Symposium en honor del Profesor Wolf-Dieter Müller-Jahncke, Académico Correspondiente, festejando así su 65 cumpleaños. Los actos programados tuvieron lugar en el Aula Magna de la Universidad Ruprecht-Karls de Heidelberg, entregándole como recuerdo la obra «Pharmazie in Geschichte und Gegenwart» en la que diversos historiadores de la Cultura, la Ciencia, la Medi-

cina y la Farmacia habían colaborado con diversos trabajos bajo la coordinación de los Profesores Christoph Friedrich, de la Universidad de Marbùrg y Director del Instituto Alemán de Historia de la Farmacia, y Joachim Telle, de la Universidad de Heidelberg.

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.

B. ENVÍO ONLINE

Todos los manuscritos deben ser enviados online en formato DOC de Microsoft Word. Descargue la plantilla para Microsoft Word DOC. El tamaño máximo de los archivos que se envían es de 4 MB, pero es aconsejable no superen los 2 MB. Alternativamente pueden ser enviados como ficheros adjuntos por correo electrónico a la oficina editorial. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia** invita a realizar contribuciones de cuatro tipos: artículos originales, comunicaciones cortas, revisiones y cartas al editor. Las contribuciones deberán regirse por la política de temática y alcance, que puede consultar en la sección Acerca de. En particular, nuestra revista anima a enviar manuscritos de investigación farmacéutica sobre aspectos prácticos.

C. PREPARACIÓN PARA EL ENVÍO

El envío de un manuscrito implica que el trabajo no ha sido sometido a evaluación o publicado en cualquier otra revista, en el mismo formato o similar, en español, inglés o en cualquier otro idioma. Los manuscritos publicados en un congreso, simposio o conferencia pueden ser sometidos a la consideración del editor, si los autores informan a la oficina editorial en el momento del envío, indicando que han realizado una revisión sustancial.

1. FORMATO

Archivos

El formato preferido es el DOC de Microsoft Word. Otros formatos aceptados son: PDF y RTF.

Archivos gráficos

Se admiten los siguientes formatos: GIF y JPEG o gráficos incrustados en Microsoft Word o Power Point.

Idioma

Sólo se aceptan manuscritos escritos en español o inglés (nativo o americano).

Unidades

Se utilizará el sistema internacional de unidades (SI). Si se mencionan otras unidades, se debe proporcionar su equivalente en el SI.

Notas a pie de página

No se aconseja el uso de notas a pie de página. Si se utilizan deben de estar incorporadas al texto.

Texto

Se utilizará espacio simple. Times New Roman de 12 puntos de tamaño. Para destacar el texto se utilizará itálica y no subrayado (excepto en direcciones URL).

Figuras

Todas las figuras deben de ser citadas en el texto y numeradas consecutivamente con números árabes. Se debe proporcionar un título de no más de quince palabras. Los formatos preferidos son PNG y JPEG. Todas las figuras se colocarán dentro del texto en los sitios apropiados, mejor que al final.

Tablas

Todas las tablas se citarán en el texto y serán numeradas consecutivamente con números árabes. Se proporcionará un título de no más de quince palabras y una leyenda que explique cualquier abreviatura usada en aquella. Todas las tablas se colocarán dentro del texto en los sitios apropiados, mejor que al final.

URL

Todas las direcciones URL (ej., <http://www.ranf.com>) deben de estar activas.

2. LONGITUD DEL MANUSCRITO**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. Aunque

los artículos cortos son aceptables, los editores no aceptan la fragmentación de un trabajo en varias publicaciones breves.

Comunicaciones

Están restringidas a informes de urgencia y de trascendencia o interés. Deben ser enviadas con una carta a los autores respecto a porqué el trabajo debe ser incluido como comunicación. El trabajo no será aceptado si, en opinión del editor, el contenido ha sido dado a conocer o divulgado en cualquier otro medio anteriormente. La extensión no debe sobrepasar las 1.500 palabras y no puede ocupar mas de tres páginas de la revista. El título, los nombres de escritores y bibliografía no cuentan. Las comunicaciones deben contener la información suficiente, pero sin entrar en detalles experimentales.

Revisiones

No deben tener una extensión superior a las 6.000 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 80 citas. Aunque la mayor parte de las revisiones serán invitaciones a petición de la Comisión Editorial, los autores interesados en contribuir con revisiones podrán contactar previamente con el Editor.

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.

Archivos Multimedia

Los autores son animados a probar los beneficios de divulgar la información complementaria en forma electrónica. Los archivos multimedia, como modelos de ordenador en 3D, vídeos y demostraciones interactivas, serán publicados online en una página web extra al manuscrito. Los formatos preferidos son MPEG y Quicktime. Información: esi.html.

Permisos

Los autores deben obtener permiso para reproducir materiales registrados como propiedad intelectual tanto en la revista impresa como en la electrónica.

3. SECCIONES DEL MANUSCRITO

En general, se debe enviar a los **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia** un único archivo DOC que incorpore: Texto, Figuras y Tablas (las figuras y tablas deben estar integradas en el texto tan cerca como

sea posible a donde estén citadas). También puede guardarse el texto (incluyendo tablas y pies de figuras) en uno de los formatos de archivo de texto aceptados (preferentemente PDF). En este caso, las figuras o fotos deben de enviarse individualmente en uno de los formatos de archivo aceptados (preferentemente JPG).

Se sugiere el siguiente formato de presentación:

Título, autor(es), dirección(es)

Sólo se permite un título conciso e informativo de no más de 100 caracteres, no incluyendo espacios entre palabras. Los nombres de todos los autores deben ser completos y con su afiliación institucional. En un trabajo multidisciplinar que implica a más de una institución, indique la afiliación individual mediante un número de árabe superescrito. El autor al que se dirija la correspondencia tiene que proporcionar la dirección completa y la dirección de correo electrónico como una nota a pie de página.

Resumen

Se deberá proporcionar un resumen en español y un abstract en inglés de no más de 200 palabras, que indique las técnicas usadas y los resultados más importantes.

Palabras clave

Se darán cinco palabras clave después del abstract.

Introducción

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

Material y métodos

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, y *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 hu-

manos 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 8623 revisada 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.

Conclusión

La conclusión es la posibilidad del autor para tener la última palabra sobre el trabajo, resumir sus pensamientos, demostrar la importancia de sus ideas y propulsar al lector a una nueva opinión 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 referencias sólo deben incluir los trabajos que son citados en el texto y que hayan sido publicados o aceptados para su publicación. Se seguirá el sistema APA. Algunos ejemplos son:

Artículos:

Desmet, P. M. A., & Hekkert, P. (2007). Framework of product experience. *International Journal of Design, 1* (1), 5766.

Artículos en Internet:

Bergen, D. (2002, Spring). The role of pretend play in children's cognitive development. *Early Childhood Research & Practice, 4* (1). Retrieved February 1, 2004, from <http://ecrp.uiuc.edu/v4n1/bergen.html>.

Libros:

Wundt, W. (1905). *Fundamentals of psychology* (7th ed.). Leipzig: Engelmann.

Traducciones de libros:

Baudrillard, J. (2006). *The system of objects* (J. Benedict, Trans.). New York: Verso (Original work published 1968).

Capítulos de libros:

Schifferstein, H. N. J., Mugge, R. & Hekkert, P. (2004). Designing consumerproduct attachment. In D. McDonagh, P. Hekkert, J. Van Erp & D. Gyi (Eds.), *Design and emotion: The experience of everyday things* (pp. 327331). London: Taylor & Francis.

Tesis doctoral o conferencias:

McNeil, P. (1993). *Designing women: Gender, modernism and interior decoration in Sydney, c. 1920-1940*. Unpublished master's thesis, Australian National University, Canberra, Australia.

Comunicaciones:

Wu, J. T., & Liu, I. M. (1987). Exploring the phonetic and semantic features of Chinese words (Tech. Rep. No. NSC75 0310 H002024). Taiwan National Science Council.

Documentos Web:

Degelman, D. & Harris, M. L. (2000). *APA style essentials*. Retrieved May 18, 2000, from Vanguard University, Department of Psychology Web site: http://www.vanguard.edu/faculty/ddegelman/index.aspx?doc_id=796.

Nielsen, M. E. (n.d.). *Notable people in psychology of religion*. Retrieved August 3, 2001, from <http://www.psywww.com/psyrelig/psyrelpr.htm>.

Gender and society. (n.d.). Retrieved December 3, 2001, from <http://www.trinity.edu/~mkearl/gender.html>.

Artículo en una base de datos:

Hien, D. & Honeyman, T. (2000). A closer look at the drug abuse maternal aggression link. *Journal of Interpersonal Violence*, 15 (5), 503522. Retrieved May 20, 2000, from ProQuest database.

Resumen de una base de datos:

Garrity, K., & Degelman, D. (1990). Effect of server introduction on restaurant tipping. *Journal of Applied Social Psychology*, 20 (1), 168172. Abstract retrieved July 23, 2001, from PsycINFO database.

D. LISTA DE COMPROBACIÓN DE PREPARACIÓN DE ENVÍOS

Como parte del proceso de envío, se les requiere a los autores que indiquen que su envío cumpla con todos los siguientes elementos, y que acepten que envíos que no cumplan con estas indicaciones pueden ser devueltos al autor.

- El envío no ha sido publicado previamente ni se ha enviado previamente a otra revista (o se ha proporcionado una explicación en Comentarios al/a la editor/a).
- El fichero enviado está en formato DOC de Microsoft Word.
- Se han añadido direcciones web para las referencias donde ha sido posible.
- El texto tiene interlineado simple; el tamaño de fuente es 12 puntos; se usa cursiva en vez de subrayado (exceptuando las direcciones URL); y todas las ilustraciones, figuras y tablas están dentro del texto en el sitio que les corresponde y no al final del todo.
- El texto cumple con los requisitos bibliográficos y de estilo indicados en las Normas para autoras/es, que se pueden encontrar en Acerca de la revista.

E. NOTA DE COPYRIGHT

Los autores que presentan un manuscrito deben saber que si se acepta para su publicación, los derechos de autor serán transferidos a la Real Academia Nacional de Farmacia. Los derechos de autor comprenden los exclusivos de reproducción y difusión en toda forma y medios de comunicación, incluyendo reimpressiones, fotografías, microfilms y cualesquiera otras reproducciones similares, además de las traducciones. La reproducción de cualquier parte de esta revista, su almacenaje en bases de datos y su transmisión por cualquier forma o medios de comunicación electrónica, copias mecánicas, fotocopias, grabaciones en entornos magnéticos, etc., deben ser autorizadas por la Real Academia Nacional de Farmacia, que es la legítima propietaria de los derechos de autor. La Real Academia Nacional de Farmacia, los editores y el consejo editorial intentarán asegurar que no se publiquen datos equivocados o engañosos. Los contenidos de los artículos publicados en los Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia son responsabilidad única y exclusiva de sus autores. Por lo tanto, la Real Academia Nacional de Farmacia, los editores, consejo editorial y director se declaran totalmente libres de cualquier responsabilidad en cuanto a las consecuencias que puedan resultar de esos datos equivocados o engañosos, de las opiniones o las declaraciones. El consentimiento del propietario de derecho de autor no se extiende a la realización de copias para la distribución general, su promoción, crear nuevas obras, o para la reventa. Debe obtenerse autorización por escrito en estos casos.

F. DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

Los nombres y direcciones de correo e introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines declarados por esta revista y no estarán disponibles para ningún otro propósito u otra persona.

