

300627

UNIVERSIDAD LA SALLE

4

**ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U. N. A. M.**

20



**"AVANCES EN LA INVESTIGACION EN
BIOQUIMICA DE POLIAMINAS"**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

GLORIA DEL CARMEN FRIAS FUENTES

DIRECTOR DE TESIS

D. en C. JOSE D. MENDEZ FRANCISCO

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

Con mucho cariño a mis padres por la comprensión, paciencia y apoyo incondicional que siempre me han brindado.

Muy especialmente al Dr. Méndez por compartir conmigo sus conocimientos, por su asesoría y por sus aportaciones en la realización de este trabajo.

A Lety y a Jorge por su amistad.

A Dan porque él siempre puede.

A mis amigos por todos los momentos que hemos compartido.

Y a todos aquellos, que en algún momento me preguntaron: "¿...Y tu tesis?"

INDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
INTRODUCCION	6
CAPITULO 1:	
GENERALIDADES	10
1.1 HISTORIA DE LAS POLIAMINAS	11
1.2 PROPIEDADES DE LAS POLIAMINAS	12
1.3 DISTRIBUCION DE LAS POLIAMINAS	13
CAPITULO 2:	
BIOSINTESIS DE POLIAMINAS	17
2.1 BIOSINTESIS DE POLIAMINAS EN CELULAS ANIMALES	19
2.2 VIAS ALTERNATIVAS DE BIOSINTESIS DE POLIAMINAS	27
CAPITULO 3:	
REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS	29
3.1 ARGINASA	31
3.2 ORNITINA DESCARBOXILASA	39
3.2.1 GENE DE LA ORNITINA DESCARBOXILASA	41
3.2.2 mRNA DE LA ORNITINA DESCARBOXILASA	44
3.2.3 LA PROTEINA ORNITINA DESCARBOXILASA	48
3.2.4 REGULACION DE LA ORNITINA DESCARBOXILASA	52
3.3 S-ADENOSILMETIONINA DESCARBOXILASA	55
3.3.1 GENE DE LA S-ADENOSILMETIONINA DESCARBOXILASA	58
3.3.2 mRNA DE LA S-ADENOSILMETIONINA DESCARBOXILASA	58

3.3.3	LA PROTEINA S-ADENOSILMETONINA DESCARBOXILASA	60
3.3.4	REGULACION DE LA S-ADENOSILMETONINA DESCARBOXILASA	62
3.4	ESPERMINA Y ESPERMIDINA SINTASA	68
3.5	ESPERMINA Y ESPERMIDINA N ¹ ACETILTRANSFERASA	69
3.6	POLIAMINO OXIDASAS	70
3.7	REGULACION POR RETROALIMENTACION DE LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS	72
3.8	INTERACCIONES ENTRE EL CICLO DE LA UREA, LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS Y EL CICLO DE KREBS.	76
3.8.1	CICLO DE LA UREA	76
3.8.2	CICLO DE ACIDOS TRICARBOXILICOS (CICLO DE KREBS)	79

CAPTULO 4:

INHIBICION DE LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS	81	
4.1	INHIBIDORES DE LA ORNITINA DESCARBOXILASA	85
4.2	INHIBIDORES DE LA S-ADENOSILMETONINA DESCARBOXILASA	85

CAPTULO 5:

EFFECTOS BIOLOGICOS DE LAS POLIAMINAS.	89	
5.1	PAPEL DE LAS POLIAMINAS EN EL CRECIMIENTO CELULAR	90
5.2	CITOTOXICIDAD DE LAS POLIAMINAS	92
5.3	INTERACCIONES DE LAS POLIAMINAS CON ACIDOS NUCLEICOS	95
5.4	EFFECTOS DE LAS POLIAMINAS EN PANCREAS	99
5.5	EFFECTOS DE LAS POLIAMINAS EN LA REPRODUCCION	100
5.5.1	HEMBRAS	100
5.5.2	MACHOS	101
5.6	METABOLISMO DE POLIAMINAS	103
5.7	METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS DONDE INTERVIEN EN POLIAMINAS	109

5.8 METABOLISMO DE POLIAMINAS EN CELULAS VEGETALES	111
CAPITULO 6:	
APLICACIONES CLINICAS DE LAS POLIAMINAS	113
6.1 DETERMINACION DE POLIAMINAS Y SUS METABOLITOS EN TEJIDOS Y FLUIDOS HUMANOS	114
6.2 REPRODUCCION	118
6.2.1 EMBRIOGENESIS	118
6.3 CANCER	120
6.3.1 PROSTATITIS	120
6.3.2 PROMOCION TUMORAL	121
6.3.3 INHIBICION DEL CRECIMIENTO TUMORAL	123
6.3.4 ORNITINA DESCARBOXILASA COMO INDICADOR DEL GRADO DE MALIGNIDAD EN NEOPLASIAS HUMANAS	125
6.3.5 QUIMIOTERAPIA	128
6.4 PSORIASIS	131
6.5 INFECCIONES PARASITARIAS	134
6.5.1 TRIPANOSOMIASIS	134
6.5.2 COCCIDIOSIS	138
6.5.3 MALARIA	138
6.6. EFECTOS ANTIMIRALES	141
6.7 SISTEMA INMUNOLOGICO	144
6.7.2 ACTIVACION DE LINFOCITOS B	144
6.8 FARMACOLOGIA DE LAS POLIAMINAS	145
CAPITULO 7:	
PERSPECTIVAS EN LA UTILIZACION CLINICA Y EN LA INVESTIGACION DE LA BIOQUIMICA DE POLIAMINAS Y CONCLUSIONES	146
BIBLIOGRAFIA	155

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Aunque en el texto se describe el significado de cada una de las abreviaturas empleadas para referirse a algunas enzimas específicas o metabolitos diversos, se considera conveniente enlistarlas a fin de facilitar la lectura de este trabajo.

ABREVIATURA	NOMBRE DE LA MOLECULA
ODC	Oritina descarboxilasa
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
MBAG	1,1'-[(metilmetanoditleno)dinitrilo]bis-(3-aminoguanidina)
DMFO	DL- α -Difluorometilornitina
GABA	α -aminobutirato
DSS	Dodecilsulfato de sodio
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Acido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
cRNA	RNA cooperador
tRNA	RNA de transferencia
rRNA	RNA ribosomal
DNA	Acido desoxi-ribonucleico

mDNA	DNA mensajero
cDNA	DNA cooperador
AMP	Adenosin 5' monofosfato
AMPc	AMP 3', 5'-cíclico
ORF	Estructura de lectura abierta (open reading frame)
A	Adenina o adenosina
C	Citosina o citidina
G	Guanina o guanosina
P	Prolina
S	Serina
T	Timina o timidina
PM	Peso molecular
No	Número
MGBG	Metilglicoxal-bis(guanilhidrazona)
AdoDATO	S-adenosil-1,8-diamino-octano
kDa	Kilo Daltons
EGBG	Etilglicoxal-bis(guanilhidrazona)
ATP	Adenosin trifosfato

ADP	Adenosin monofosfato
LD50	Dosis letal 50
TPA	12-Orto-tetradecanolforbol-13 acetato
DMBA	7,12-dimetilbenza- α -antraceno
SNC	Sistema nervioso central
CML	Leucemia mieloide crónica
DNM	Detectable pero no medible
CMV	Citomegalovirus
HVS-2	Herpesvirus simple II
TMBA	N, N'Diacetilputrescina (tetramilien-bis-acetamida)
HMBA	N, N' Diacetilputrescina (hexametilen-bis-acetamida)
AcCoA	Acetil coenzima A
EDTA	Acido Etilendiamino acético

RESUMEN

Las poliaminas son un grupo de moléculas orgánicas, catiónicas y polivalentes que intervienen en un gran número de funciones biológicas tanto normales como patológicas. Por esta razón se produjo un auge en la investigación de estas sustancias a nivel mundial.

La observación de que la falta de poliaminas durante la división, diferenciación y reproducción celular altera el desarrollo normal, ha conducido a sintetizar diversos inhibidores específicos de la biosíntesis de poliaminas.

Esta inhibición puede causar efectos terapéuticos en enfermedades donde es importante detener el crecimiento celular, como en cáncer, parasitosis, psoriasis e infecciones virales, entre otras.

Por otra parte, la determinación de poliaminas en tejidos y fluidos biológicos puede ser un indicador de ciertos estados patológicos, ya que las concentraciones de poliaminas aumentan en forma directa a la proliferación celular.

Las perspectivas en la utilización de estas sustancias a nivel clínico y diagnóstico son muy prometedoras, pero todavía hace falta conocer muchos aspectos de la bioquímica de poliaminas para lograrlo.

INTRODUCCION

Las poliaminas son cationes orgánicos polivalentes de bajo peso molecular, que se encuentran ampliamente distribuidas en múltiples sistemas celulares tales como bacterias, hongos, levaduras, plantas y células de diversos tejidos. En cada uno de los cuales desempeñan funciones específicas.

Pueden encontrarse tanto en eucariontes como en procariontes, en forma de bases alifáticas libres o conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos, péptidos o como unidades subestructurales de numerosos alcaloides (1).

La putrescina, espermidina y espermina constituyen el grupo de poliaminas más estudiadas (Figura 1).

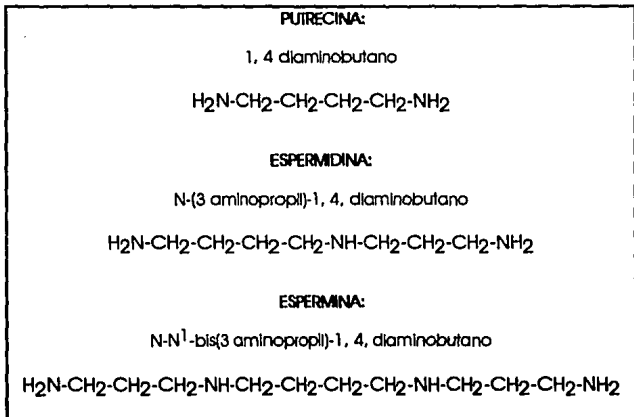


Figura 1: Nombres y fórmulas químicas de las poliaminas más estudiadas (1).

También existe otro tipo de poliaminas, las cuales son menos comunes y se encuentran principalmente en plantas y bacterias (Figura 2).

Las poliaminas están involucradas en diversas funciones biológicas, se sintetizan en grandes cantidades durante el crecimiento de tejido normal y neoplásico (45). También destacan durante la diferenciación, división y proliferación celular.

Así mismo, tienen efectos importantes en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (46), por ejemplo: estabilizan la estructura secundaria del DNA, protegiéndolo de la desnaturalización térmica y de la degradación enzimática.

Debido a todo esto y a la amplia participación de las poliaminas en procesos biológicos, actualmente se ha dado auge al estudio de las poliaminas en diversas áreas de la investigación. Por lo cual se consideró importante realizar un análisis de los avances en la investigación de estas moléculas.

DIAMINAS	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 1-3 Diaminopropano
	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ Cadaverina
	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ Norespermidina
TRIAMINAS	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ Aminopropilcadaverina
	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ Homoespermidina
	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ Norespermina
TETRAMINAS	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ Termoespermina
	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ Canavalmina
PENTAMINAS	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ Caldopentamina
	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ Homocaldopentamina

Figura 2: Fórmulas de otras poliaminas estudiadas.

GENERALIDADES

HISTORIA DE LAS POLIAMINAS

La presencia de poliaminas en materiales biológicos se reportó hace más de 300 años, desde el descubrimiento de los ácidos nucleicos (81).

Antony Van Leewenhoek informó por primera vez en 1678 a la Royal Society en Londres, la formación de cristales de espermina en muestras de semen humano (81). En 1791, Nicolás Vauquelin estudió la naturaleza de estas sales y demostró la relativa insolubilidad de los cristales en agua y etanol, definiéndolas como "cristales transparentes, en forma de línea larga, muy delgada, agrupados de tal modo, que representan los radios de una rueda", concluyendo que se trataba de sales de calcio (55).

Posteriormente estos cristales fueron redescubiertos en varias ocasiones. En 1865 los cristales fueron descritos nuevamente por Boettcher, quien supuso que la sustancia de la que estaban formados era una proteína a la que llamó espermatina.

Scheiner en 1878 postuló que los cristales eran sales de fosfato a partir de un compuesto orgánico básico simple. Diez años después A. Landenburg y J. Abel le dieron el nombre de espermina a esta base orgánica.

Finalmente en 1926, se determinó su estructura química simultáneamente en Alemania e Inglaterra y se confirmó sintetizando otra base conocida como fosfato de espermidina (1, 55).

Investigaciones posteriores mostraron que la espermidina podía obtenerse de órganos de animales, microorganismos y plantas. Sin embargo, todavía no se conoce con certeza la importancia de estas sales en procesos celulares y moleculares (81).

La putrescina fue aislada en 1879 gracias a los trabajos de Brieger y sintetizada 7 años después, como sales dobles de metales pesados a partir de tejidos animales. A este investigador también se le atribuye el descubrimiento de la cadaverina (1, 2).

PROPIEDADES DE LAS POLIAMINAS

Las poliaminas son bases nitrogenadas alifáticas de bajo peso molecular. A pH fisiológico la putrescina, espermidina y espermina son protonadas y tienen 2, 3 y 4 cargas positivas respectivamente (64). Otras propiedades de estos compuestos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Algunas propiedades de las poliaminas más comunes.

NOMBRE	Mr	Pk _a
Putrescina	88.15	8.71
Espermidina	145.25	10.96 9.91 8.51
Espermina	202.34	10.86 10.05 8.82

Debido a su carga positiva, las poliaminas pueden unirse fuertemente a ácidos nucleicos y a otros constituyentes celulares cargados negativamente, por lo cual sólo fracciones menores de el total de los pools Intracelulares son metabólicamente activos (85), por esta razón se sugirió, que las poliaminas pueden contribuir a la neutralización de la carga negativa de una cadena de DNA (64).

Tradicionalmente se ha asumido que las poliaminas ejercen su función biológica por virtud de su carga positiva (85).

Actualmente se ha demostrado que en mamíferos, los niveles tisulares más altos de estas moléculas se encuentran en órganos que llevan a cabo una síntesis activa de RNA (46), como la médula ósea, la próstata y el páncreas. En este último se han detectado altas concentraciones de espermina, principalmente en células productoras de insulina (47, 50).

También se sabe que en ciertos estados biológicos se incrementa la concentración de poliaminas, como son el crecimiento, el embarazo, en el feto y en el neonato y en estados patológicos como acromegalia, neoplasias y psoriasis, entre otros (1).

DISTRIBUCION DE LAS POLIAMINAS

La distribución de las poliaminas en la naturaleza es muy amplia, ya que pueden encontrarse en tejidos animales, vegetales y microorganismos. Sin embargo, las concentraciones relativas de estos compuestos varían

notablemente dependiendo del tipo de células (Tabla 2) y en función del ciclo celular (Figura 3).

En general, los procariontes tienen más altas concentraciones de putrescina que de espermidina y carecen de espermina, mientras que en los mamíferos y en general en todos los organismos eucariontes, la espermidina y la espermina están presentes en la mayor parte de los tejidos, mientras que la putrescina se encuentra en bajas concentraciones, con excepción de los tejidos que se encuentran estimulados al crecimiento que muestran un compartimiento celular proliferativo, por ejemplo la médula ósea.

Campbell realizó una amplia descripción de la participación de las poliaminas en relación con sucesos normales y trastornos del crecimiento, enfermedades genéticas y otras alteraciones como las renales.

Otros autores han determinado los patrones de acumulación intracelular de poliaminas durante el crecimiento y la diferenciación de células normales y neoplásicas, en cultivo y en tejidos de animales.

Como ejemplos tenemos que la relación espermina-espermidina es menor de 1.0 en tejidos con actividad biosintética baja o en tejidos diferenciados con una velocidad constante de síntesis de RNA y de proteínas. Una relación de 2.0 se encuentra en tejidos con hipertrofia o hiperplasia.

Se sabe que la concentración de espermina es mayor en tejidos diferenciados, que disminuye durante los procesos de diferenciación, como en la regeneración del hígado y que la disminución es constante con la edad.

Tabla 2: Concentración de poliaminas en diferentes sistemas biológicos (1).

TEJIDO/ SISTEMA ESPERMINA	FUTRESCINA	ESPERMIDINA	
Mamíferos	-	1 mM	1 mM
Hígado de ratón	0.1	0.61	0.02
Lóbulo frontal humano	0.015	0.23	0.18
Próstata de rata	-	7.73	4.77
Páncreas de rata	-	8.62	0.80
Plasma seminal humano	0.23	0.11	3.04
<u>Escherichia coli</u>	15.00	1.50	-
<u>Pseudomona sp.</u>	4.60	-	-
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	5.60	-	-
<u>Lactobacillus casei</u>	-	-	0.10
<u>Shigella sonnei</u>	14.00	-	-
<u>Acetobacter vinelandii</u>	13.00	-	-
<u>Bacillus subtilis</u>	11.00	-	-
<u>Aspergillus niger</u>	4.00	-	-
<u>Aspergillus nidulans</u>	-	0.16	0.40
<u>S. cerevisiae</u> -	-	1.40	0.60

Por otra parte, el hecho de que las poliaminas puedan detectarse extracelularmente ha conducido a realizar varios trabajos que tienden a cuantificarlas en fluidos biológicos de diversas entidades clínicas (1).

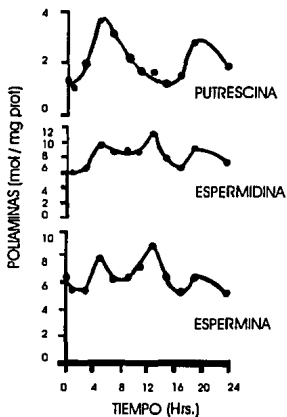


Figura 3: Cambios en el contenido de poliaminas durante el ciclo celular.

CAPITULO 2

BIOSINTESIS DE POLIAMINAS

Como ya hemos mencionado, es cuando las células son estimuladas para crecer y dividirse, se da una rápida inducción en la biosíntesis de poliaminas (64).

Para poder explicar la biosíntesis de poliaminas es necesario establecer primero el sistema biológico en cuestión y aunque, en general, se sigue la misma ruta en animales, vegetales y microorganismos a partir de putrescina, los primeros pasos son diferentes.

En los mamíferos, la biosíntesis de poliaminas se lleva a cabo a partir de ornitina (Figura 4), este compuesto proviene del plasma y también puede ser formado intracelularmente por acción de arginasa.

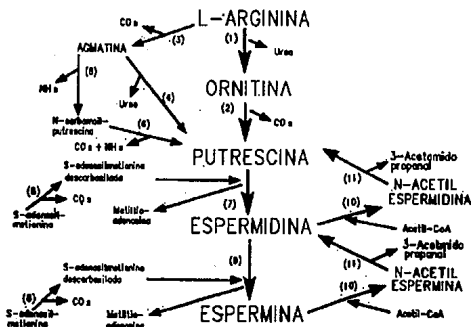


Figura 4: Biosíntesis e interconversión de las poliaminas. Enzimas involucradas: (1) Arginasa, (2) ODC, (3) Arginina descarboxilasa, (4) Agmatinasa, (5) Agmatina deaminasa, (6) N-carbomilputrescina aminohidrolasa, (7) Espermidina sintasa, (8) SAMDC, (9) Espermina sintasa, (10) Espermidina/espermina N-acetiltransferasa, (11) Poliamino óxidasa.

La arginasa es una enzima que está ampliamente distribuida en tejidos y es posible encontrarla en tejidos extrahepáticos, donde facilita la disponibilidad de ornitina para la biosíntesis de poliaminas. Por lo cual la arginasa puede ser considerada como una de las enzimas que regulan la etapa inicial de la biosíntesis de poliaminas, debiendo recordarse que su participación fisiológica se relaciona con el ciclo de la urea (1, 61)(Figura 5).

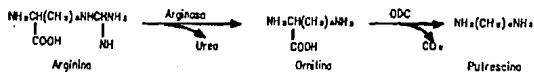


Figura 5: Biosíntesis de putrescina en células animales.

La putrescina es el precursor de la síntesis de espermidina y espermina (Figura 4); en las células animales esta diamina se obtiene a partir de ornitina. Sin embargo, en células vegetales superiores, en bacterias y hongos la putrescina puede obtenerse a partir de otras vías que veremos más adelante.

BIOSÍNTESIS DE POLIAMINAS EN CELULAS ANIMALES

La ornitina descarboxilasa (ODC) cataliza el primer paso clave en la biosíntesis de poliaminas en células animales catalizando la conversión de ornitina en putrescina. A partir de una estimulación en el crecimiento la actividad de la ODC se incrementa varios cientos de veces (64) como respuesta a diversos

El producto de la descarboxilación (S-adenosilhomocisteína) es utilizado como donador de grupos proplamina ((CH₂)₃-NH₂) para la síntesis de espermidina y espermina (Figura 7)(61). La producción de S-adenosilhomocisteína se mantiene a bajas concentraciones y es el factor limitante en la formación de espermidina.

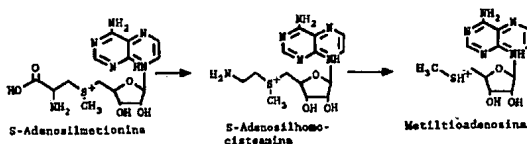


Figura 7: Mecanismo de obtención de los grupos proplamina.

Esta enzima es un importante paso regulatorio en la biosíntesis de poliaminas y en el metabolismo de la adenosilmetionina ya que la adenosilmetionina descarboxilada es virtualmente inactiva como donadora de un grupo metilo además de que su concentración celular normal es muy baja (menos del 5 % de la concentración de adenosilmetionina); una vez que se ha llevado a cabo la descarboxilación, la adenosilmetionina forma parte, de manera irreversible, de la biosíntesis de poliaminas (95).

La SAMDC de mamíferos es activada por putrescina e inhibida por espermidina; esta enzima, que depende del piruvato como cofactor, está presente en los tejidos en muy bajas concentraciones (0,015 % de la proteína

soluble en próstata y 0.0007 % en hígado), su actividad está regulada por muchas hormonas y otros estímulos que promueven el crecimiento (61).

En la reacción catalizada por SAMDC para obtener grupos proplamina también se produce metiloadenosina, que se hidroliza por acción de la enzima metiloadenosina fosforilasa formando adenina, se recupera como el nucleósido metil-ribose-1-fosfato que es posteriormente es reconvertido a metionina. Este metabolismo ocurre a través de una compleja serie de reacciones, que todavía no están bien caracterizadas.

Posteriormente se incorporan grupos proplamina para la síntesis de espermidina y espermina por acción de las enzimas espermidina sintasa y espermina sintasa, respectivamente (Figura 8). Estas reacciones son reguladas por la disponibilidad del sustrato específico, particularmente la S-adenosilhomocisteína.

Tanto la espermina como la espermidina pueden ser convertidas a putrescina por acción de la N-acetiltransferasa (que actúa con acetil coenzima A -AcCoA-), el primer paso para esta conversión es la acetilación de un grupo propilamina de la espermina por medio de la enzima espermina N¹-acetiltransferasa obteniendo N¹-acetilespermina.

Posteriormente estos compuestos son hidrolizados a nivel del nitrógeno interno por acción de poliamino oxidasa obteniéndose espermidina o putrescina y N-acetilpropionaldehído, dependiendo del sustrato (Figura 9).

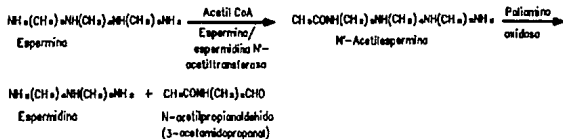


Figura 9: Conversión de espermina en espermidina mediante acetilación por espermina/espermidina N¹-acetiltransferasa y posterior oxidación mediante poliamino oxidasa.

Como en condiciones fisiológicas los derivados acetilados son metabolizados rápidamente, podríamos decir que la acetilación es el paso limitante en esta interconversión, además de que la espermidina-N¹-acetiltransferasa muestra una rápida e intensa reducción por exposición a agentes tóxicos, que resulta en la conversión de espermidina en putrescina y de espermina en espermidina (1, 4). Además de la putrescina, también se obtiene durante la reacción un aldehído, el cual por una serie de reacciones se convierte en β-alanina (ácido 3-amino-propiónico) (Figura 10).

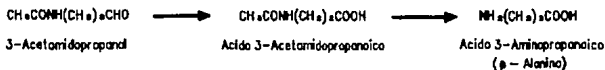


Figura 10: Formación de β -alanina a partir de 3-acetamido-propanal.

La putrescina que se obtiene en estas reacciones puede ser oxidada por la diamina oxidasa para producir gama-aminobutiraldehído en lugar de convertirse en espermidina, el cual puede ser posteriormente oxidado a gama-aminobutirato (GABA), o bien, dar origen a compuestos cíclicos, por ejemplo Δ -pirolina.

Por otra parte, la putrescina también puede ser acetilada por una enzima microsomal y la monoacetilputrescina resultante puede ser oxidada por una monoamina oxidasa produciendo GABA (Figura 11). Estas reacciones pueden ocurrir en tejidos con una baja actividad de diamina oxidasa como el cerebro (61).

La acetilación de poliaminas también puede llevarse a cabo por una enzima nuclear, que utilizando espermidina como sustrato, forma N^6 -acetilespermidina (61).

En tejidos de rata se han encontrado solamente pequeñas cantidades de derivados acetilados aún en el mayor pico de inducción, ya que la actividad de la poliamino oxidasa es aún mayor.

VIAS ALTERNATIVAS DE BIOSINTESIS DE POLIAMINAS

La agmatina es una enzima que no está presente en las células de mamíferos y eucariontes inferiores (55), pero está ampliamente distribuida en las plantas, esta enzima es producida por la descarboxilación de arginina.

Una de las vías por las que puede formarse putrescina a partir de agmatina es la vía N-carbamoylputrescina, la cual está catalizada por la enzima N-carbamoylputrescina amidohidrolasa, en esta reacción se desprende bióxido de carbono y amoníaco. Esta reacción se lleva a cabo en plantas como el Lathyrus sativus (Figura 12).

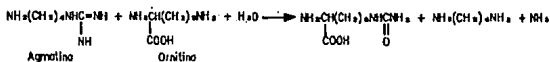


Figura 12: Biosíntesis de putrescina en Lathyrus sativus.

Mediante otra vía, la agmatina es hidrolizada en putrescina y urea por acción de la agmatinasa (Figura 13).

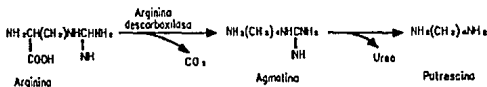


Figura 13: Biosíntesis de putrescina en bacterias y plantas.

Algunos organismos poseen ambas rutas para la biosíntesis de putrescina, por ejemplo: Escherichia coli.

En cierto número de bacterias y plantas la biosíntesis de poliaminas se lleva a cabo por la vía clásica, en donde el L-aspartato-semialdehído es el donador de grupos propilamina en la biosíntesis de espermidina, un ejemplo es el Lathyrus sativus (Figura 14).

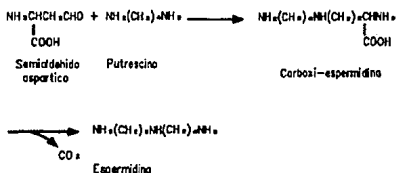


Figura 14: Biosíntesis de espermidina en bacterias y plantas.

CAPITULO 3

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS

La regulación de la biosíntesis de poliaminas y de la ruta de la interconversión (Figuras 4 y 15), depende de las siguientes enzimas: arginasa, ornitina descarboxilasa (ODC), S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) y espermina/espermidina N¹-acetiltransferasa.

Las otras enzimas (espermidina sintasa, espermina sintasa y poliamina oxidasa) están reguladas principalmente por la disponibilidad del sustrato específico (1, 3).

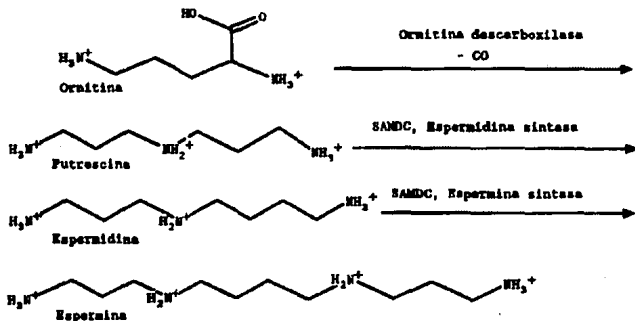


Figura 15: Biosíntesis de poliaminas (96).

ARGINASA

Como ya se ha mencionado, la arginasa es de vital importancia en la etapa inicial de la biosíntesis, ya que proporciona la ornitina necesaria para su conversión a putrescina.

La arginasa (L-arginasa-aminohidrolasa) es la enzima que cataliza la hidrólisis de la L-arginasa a L-ornitina y urea. Inicialmente fue detectada en hígado de mamíferos como la enzima terminal del ciclo de la urea (9).

Normalmente, la arginasa no está presente en hígado de organismos uricotélicos (reptiles y aves en los que la excreción de nitrógeno amínico se realiza en forma semisólida como suspensión de ácido úrico sólido) en los cuales su actividad es notable.

Además de la función hepática, la actividad de la arginasa está asociada con la regulación de diversos procesos celulares. Esta enzima se encuentra en diferentes tejidos en mamíferos y en otros sistemas vivos (granos vegetales en germinación, levaduras, bacterias y algunos hongos) (10), esto indica que su presencia es esencial para que se lleven a cabo procesos básicos de la función celular.

La actividad extrahepática de la arginasa ha sido reportada en riñón (11, 12), Intestino delgado (13, 14), cerebro (15), tiroides (16), epidermis (17, 18), páncreas (19), glándula mamaria lactante (22, 23), eritrocitos (24, 27), linfocitos

y granulocitos leucémicos (25), en líneas de células tumorales en cultivo (26), en suero normal (28) y en diversas patologías (29, 30, 31).

Se le atribuye a la arginasa distribuida en tejidos extrahepáticos, la función de facilitar la disponibilidad de ornitina necesaria para la biosíntesis de poliaminas, prolina y glutamato; por lo cual la arginasa interviene indirectamente en la biosíntesis de poliaminas (32).

La estructura de la arginasa es oligomérica, consiste en un tetrámero formado por cuatro monómeros, cada uno de los cuales tiene un peso molecular de 30,000 a 40,000 y un ión manganeso (Mn) íntimamente ligado.

La arginasa hidroliza enlaces C-N no peptídicas y tiene afinidad por el sustrato L-arginina, no es afín a los isómeros D-arginina y L-homoarginina.

Se han realizado investigaciones en la especificidad de la arginasa por los sustratos como por ejemplo: sustratos portadores de un resto guanidínico-sustituido y derivados monosustituidos, los cuales no pueden ser sustratos de la arginasa si no cumplen con las siguientes condiciones:

- 1) Tener un radical NH_2 libre en el grupo guanidínico y un carboxilo asociado a un grupo NH_2 o un OH en alfa.
- 2) Que exista una separación determinada entre ambos radicales.

La arginasa se combina con el resto guanidínico de ambas partes, la orientación del grupo activo descansa sobre la atracción del manganeso por el grupo

carboxilo, amino o hidroxilo del sustrato. El metal se comporta como coordinador entre la enzima y el sustrato por medio de los grupos terminales.

La arginasa actúa sobre la canavanina, y de forma moderada sobre la cupleína y la monobenzoil-arginina, ácido guanidin-acético, creatinina y creatina (1).

Se han identificado varias isoenzimas para la arginasa, las cuales presentan diferencias en algunas propiedades básicas, p.e. movilidad electroforética, solubilidad, termosensibilidad, etc.

La caracterización de las Isoenzimas tiene el propósito de identificar la relación entre las propiedades bioquímicas de la enzima y la función fisiológica de cada forma molecular.

Las isoenzimas son utilizadas para la dirección de metabolitos a través de rutas metabólicas específicas (33). También pueden tener una función catalítica determinada para una estructura o compartimiento celular.

Desde su descubrimiento, han sido relacionadas con la diferenciación tisular. Por otra parte, existe una posibilidad de que las isoenzimas sean proteínas vestigiales remanentes de la evolución genética.

Las propiedades de la arginasa dependen de su fuente de extracción (Tabla 3), ya que la arginasa obtenida de hígado de rata es la más caracterizada, tiene un peso molecular de 9.5 (34), no es fácilmente desnaturalizada por ácidos, aunque el tratamiento con ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) provoca

su inhibición por remoción del manganeso, inhibición que puede revertirse con adición de iones Mn^{+2} en el medio (35).

El pH óptimo para la actividad isoenzimática es 9.3 - 10.0. Existe una variedad de iones metálicos que activan y/o estabilizan a la arginasa de diferentes tejidos (36), p.e. Mn^{+2} , Co^{+} , Ni^{+3} y Fe^{+3} . Los iones Cu^{+} , Hg^{+2} y Ag^{+} destruyen la actividad enzimática por precipitación.

Tabla 3: Diferentes propiedades de las isoenzimas de la arginasa.

ANIMAL ARGININA	TEJIDO	PM (Da)	pH OPTIMO	Km
Rata	Hígado	120,000 -	10-10.6	2.4
		142,000		13 - 45 20 - 40
	Riñón	120,000	7.5 y 3.9	18.00
	Intestino	120,000	10	19.00
Caballo	Hígado	138,000		7.00
Conejo	Hígado	138,000		1.40
Oveja	Hígado			0.9 - 28
Vaca	Hígado	115,000	9.5 - 10.5	1.00
		120,000		10.80
Ratón	Epidermis		9.5	20 - 40

Estos iones protegen a la arginasa de hígado de rata de la *disociación con dodecil sulfato de sodio (DSS), ya que se sugiere que están directamente involucrados en la creación de la forma tetramérica de la enzima (36).

Estudios de resonancia magnético: nuclear (RMN) del enlace Mn^{+2} en arginasa obtenida de hígado de rata, muestran que la enzima con una actividad catalítica residual del 50 %, no se disocia en subunidades y contiene dos moles

de manganeso por mol de arginasa (37). Lo cual concluye que la enzima existe en la forma E-Mn⁺².

La remoción de los iones Mn⁺² activantes por cualquier medio, produce la inactivación de la enzima debido a su división en subunidades.

Hunter, et.al., (38) reportaron que la arginasa de hígado bovino muestra una actividad reducida en presencia de hidrolizados de proteína y que esta actividad disminuida se debe a la interacción de diversos aminoácidos con arginasa, lo cual inhibe la enzima. Estas combinaciones pueden producir cambios conformacionales, los cuales deterioran el recambio del complejo enzima-sustrato.

Así, los inhibidores competitivos de arginasa de hígado bovino fueron ornitina y lisina, y los inhibidores no competitivos fueron los aminoácidos isoleucina, valina y cisteína.

También se han reportado (38) la inhibición de la enzima en hígado de bovino por aminoácidos poco comunes como la norvalina, norleucina y el ácido aminobutírico.

Estudios detallados de cinética de inhibición de arginasa por diferentes aminoácidos pueden ayudar a explicar el aumento en la actividad de la arginasa hepática, reportado en vertebrados bajo la influencia de ciertos factores como dietas altas en proteínas (39), inanición (40), hormonas glucocorticoides (41), etc.

Kesevarao, et.al., (42), estudió el efecto de 18 aminoácidos distintos en la actividad de arginasa de hígado de oveja (Tabla 4).

Tabla 4: Efecto de los L-aminoácidos sobre hígado de oveja.

AMINOACIDO (50 mM)	ACTIVIDAD DE ARGINASA (m DE UREA/mg PROTEINA)	PORCENTAJE DE CAMBIO
Control	147.3	-
Alanina	162.8	+ 10.5
Serina	156.4	+ 6.2
Treonina	142.9	- 3.0
Aspartato	140.4	- 4.7
Glutamato	135.7	- 7.9
Cistina	135.5	- 8.2
Metionina	140.6	- 4.6
Valina	32.7	- 77.8
Leucina	53.5	- 63.6
Lisina	46.2	- 68.6
Ornitina	27.6	- 81.3
Tirosina	155.7	+ 5.7
Fenilalanina	138.4	- 6.0
Triptófano	138.4	- 6.0
Histidina	175.1	+ 18.9
Prolina	98.4	- 33.3

Los aminoácidos alanina e histidina mostraron una ligera estimulación en la actividad enzimática.

Además de la prolina, solamente los aminoácidos acíclicos monocarboxílicos con 2 o más átomos de carbono (leucina, valina, lisina y ornitina) inhibieron a la arginasa de hígado de oveja. La arginina, el sustrato de la enzima, contiene 6 átomos de carbono.

Probablemente la longitud de la cadena carbonada es crítica en el aminoácido inhibidor para competir efectivamente con el sitio activo. La

ornitina, la lisina y prolina mostraron ser inhibidores competitivos. Para la arginasa de hígado de rata la ornitina actúa como inhibidor no competitivo.

El glutamato y metionina que contiene solamente 5 átomos de carbono no inhiben a la enzima. La presencia de un segundo grupo carboxilo en el glutamato y un átomo de azufre en la metionina, quizá disminuya su eficacia en la competencia por el sustrato.

La arginasa de cerebro de oveja es inhibida significativamente por la leucina, valina, lisina u ornitina; sin embargo la inhibición provocada por prolina no es muy significativa (tal como ocurrió para la arginasa de hígado de oveja).

Esto puede ser debido a la posibilidad de que la arginasa esté involucrada en la síntesis de prolina en el cerebro (43). Además de los aminoácidos anteriormente mencionados, también inhiben a la arginasa: el ácido clorogénico y sus derivados, colorantes de trifenilmetano, ácido fosfórico y sulfonil urea (44).

Algunas investigaciones de interés particular son las que reportan inhibidores competitivos y no competitivos de bajos pesos moleculares de arginasa, solubles y estables a 100°C. Estos inhibidores no han sido lo suficientemente purificados como para permitir su identificación, pero sus propiedades sugieren que éstos son purinas y pirimidinas.

Así los productos del metabolismo de los ácidos nucleicos pueden influenciar el ciclo de la urea "in vivo". Algunos inhibidores de arginasa de estructura

conocida (44), aparentemente se asemejan a la arginasa sin poseer un grupo guanidino.

Rosenfeld, et.al., (44), han reportado que varias purinas son inhibidores competitivos de la arginasa de hígado bovino y que las pirimidinas son inhibidores no competitivos. De las purinas, el inhibidor competitivo más potente es el ácido úrico. La inosina es la que presenta una unión más débil para la L-arginina; el valor de K_m encontrado fue 300 - 400 mM (Tabla 5).

Tabla 5: Inhibidores purínicos y pirimidínicos de arginasa obtenida de hígado bovino.

INHIBIDOR	COMPETITIVO	K_i (moles)
Adenosina	Si	30
Insina	Si	40
Adenina	Si	14
Acido úrico	Si	9
Citidina	No	5
Citosina	No	0,9

ORNITINA DESCARBOXILASA

La ornitina descarboxilasa (ODC) es la enzima más estudiada en la familia de las poliaminas, ya que se conocen diversos Inhibidores, potentes y específicos que actúan sobre ésta y nos permiten realizar diversos estudios en sistemas biológicos donde se bloquea la biosíntesis de poliaminas.

La ODC es una enzima extremadamente lábil, se encuentra en las células en estado fisiológico de latencia en niveles bajos, generalmente representa el 0.0001 % del total de proteína celular (64).

En riñones de ratón estimulados con andrógenos, la ODC representa el 0,05 % de proteína soluble después de la inducción máxima. Por lo que el riñón de ratón es la principal fuente de obtención de la enzima (5). La síntesis de ODC puede representar el 1 % de la síntesis total de proteína soluble (64).

La ODC también se ha aislado en microorganismos, hígado de rata y de ternera.

La actividad de la ODC depende de fosfato de piridoxal, que tiene una estructura dimérica, se encuentra en el núcleo y en el citoplasma, pero después de una inducción la mayor actividad está en el citoplasma (6).

Hay evidencias de que la mayor actividad de la ODC se encuentra después de la estimulación de una variedad de sistemas biológicos regulados para el crecimiento. Por ejemplo: la actividad celular de la ODC es comparada, como

una función de tiempo, a la acumulación de poliaminas intracelulares en linfocitos T activados mitogénicamente (Figura 16).

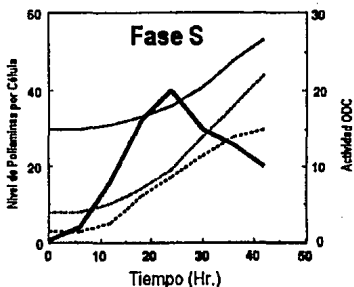


Figura 16:

Comparación de los niveles de ODC y poliaminas después de la activación mitogénica de linfocitos T. Los L-T se activaron con concanavalina A en el tiempo cero y se siguieron la ODC (AAA), putrescina (---), espermidina (-x-) y espermina (x x x), como una función de tiempo (85).

La actividad enzimática comienza a acumularse antes de que se cumplan 5 hr de la activación celular y se alcanza el pico de actividad al tiempo en que entra a la fase S. Como se esperaba, los niveles de poliaminas fue similar al incremento de la actividad ODC (85).

descarboxilación forma un intermediario electrofílico en el sitio activo de la enzima unido por un enlace covalente, la enzima queda inactivada de manera reversible (4).

Gene de la ODC

Las cantidades excepcionalmente grandes de ODC mRNA presentes en riñón de ratón estimulado con andrógenos y en líneas de células resistentes a DMFO, sirvieron como vehículo para la clonación molecular del cDNA de ODC de ratón.

La acumulación de mRNA de ODC en el riñón de ratón como respuesta a andrógenos, parece ser debida a la estabilización del mensaje, mientras que en células resistentes a DMFO es normalmente causada por la amplificación del gene funcional de la ODC.

La cual es promovida por la eliminación de pollaminas y se ha observado en muchas líneas celulares después de una larga exposición a DMFO. La eliminación de pollaminas en células deficientes de arginasa, por omisión de ornitina en el medio de crecimiento, también ha inducido la amplificación del gene de la ODC.

Algunas de las líneas celulares obtenidas producen ODC como su proteína principal, que comparadas a células parenterales, las sobreproductoras de ODC pueden contener varios cientos de veces exceso de mRNA de ODC, y su síntesis puede cuantificarse en el 20 % de la síntesis total de proteína.

Un análisis bajo estrictas condiciones de hibridación por southern blot de restricción de DNA con digestión de endonucleasa de DNA genómico, han revelado que hay una familia (posiblemente de más de 12 miembros) de genes ODC en ratón.

Los miembros de esta familia multigénica parece estar dispersa y se han encontrado por lo menos, seis cromosomas. En líneas celulares de ratón resistentes a DMFO, solamente uno de los genes de ODC (dando un fragmento EcoRI de 6-7 kb) es amplificado, lo cual indica que representa al gene activo. Los otros genes de ODC relacionados parecen ser pseudogenes.

Las secuencias de clonas genómicas recombinantes del gene de la ODC han sido descritas en levaduras, tripanosoma, ratón, rata y en el humano. Las secuencias genómicas de las levaduras y del tripanosoma unen intrones, mientras que 11 intrones interrumpen esas secuencias en los mamíferos.

Las posiciones de los 12 exones en los genes de mamíferos fueron interferidas por comparación de las secuencias de nucleótidos del cDNA y del DNA genómico (Figura 17). Los primeros dos exones forman la mayor parte del extremo 5' líder no-traducido, y el último exón forma parte de la región codificada tan bien como el extremo líder 3' no-traducido.

Se ha encontrado que los genes ODC de tumor de ratón están extensamente metilados, pero permanece sin determinarse si el grado de metilación juega un papel en la regulación de la actividad del gene.

Es interesante la metilación de residuos de citosina como un medio de regulación de la actividad del gene, en vista la riqueza en GC de la región promotora. El extremo 5' no-traducido contiene varios elementos promotores-incrementadores: una caja TATA, una caja CAAT colocaliva, una caja GC y varias secuencias de un elemento responsivo AMPc y de varios SP1 colocalivos de sitios de unión de factores de transcripción. (64)

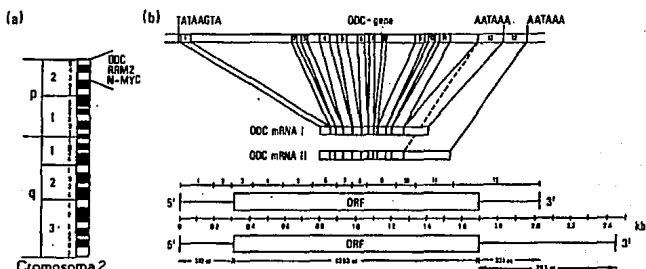


Figura 17:

Localización cromosómica del gen humano de la ODC y estructuras generales del gen de ratón de la ODC y sus dos mRNAs de ODC alternativos. El gen de la ODC en el cromosoma 2 se encuentra en la región del extremo corto (2p231ter), el cual también contiene un proto-oncogene (N-MYC) y la subunidad (RRM2) del gene que codifica para la ribonucleótido reductasa M2.

El gen de la ODC de ratón contiene 12 exones y 11 intrones, el extremo superior del gen es una caja TATA, una caja CAAT colocaliva y una caja GC, y el consenso de secuencias de un elemento responsivo cAMP y de muchos sitios de unión de factores de transcripción SP1 colocalivos. En el extremo 3' del gen existen dos juegos de secuencias de consenso fuertemente conservadas (AATAAA), que actúan como una señal de poliadenilación. La transcripción primaria se procesa en un mRNA conteniendo regiones 5' y 3' no traducidas y un ORF que los traduce en los 461 residuos de aminoácidos de ODC (64).

Los ensayos realizados de expresión transitoria en células de ratón, han revelado que la región promotora de ODC de ratón, es casi tan fuerte como la repetición del extremo líder del virus de sarcoma Rous, y algo más fuerte que el promotor SV40.

A diferencia del genoma de ratón, el genoma humano haploide parece contener solamente dos genes de ODC; estos dos pueden incrementar al mRNA simple de ODC (2.2 -2.3 kb) de las especies expresadas en células humanas, o probablemente uno podría ser un pseudogene.

Los experimentos realizados con clones híbridas de células somáticas indican que las secuencias humanas de ODC se localizan en los cromosomas 2 y 7. La secuencia de ODC en el cromosoma 2 se encuentra en la región del extremo corto, el cual contiene el gene N-MYC que es frecuentemente amplificado en neuroblastomas y en carcinomas pulmonares de células pequeñas (Figura 17).

También se han observado co-amplificaciones del gene N-MYC y del de la ODC en algunos neuroblastomas. Del mismo modo, co-amplificaciones de los genes activos de la ODC y de la subunidad M2 del ribonucleótido reductasa (también localizado en la región terminal del extremo corto del cromosoma humano 2) en células de mamíferos seleccionadas por su resistencia a la hidroxil-urea.

mRNA de la ODC:

Las células de roedores contienen por lo menos dos especies de mRNA del ODC, de 2.0-2.4 y de 2.6-2.7 kb de longitud. Sus cantidades relativas varían

entre la especie. En las especies más cortas rata y ratón, es más común el mRNA más largo, mientras que la situación contraria es el hamster.

La heterogeneidad de tamaño se debe principalmente a las diferentes longitudes de los extremos 3' no-traducidos, consistente con la presencia de dos señales de poliadenilación en el gene. La estructura abierta de lectura (ORF = open reading frame) que codifica para la proteína ODC tiene 1383 nucleótidos de largo.

Los tejidos humanos, en contraste con los roedores, expresan solamente una de las especies de mRNA del ODC, que es ligeramente más largo que el más corto de los dos mRNAs de ratón.

El mRNA de la ODC pertenece a la pequeña clase de mRNA mamíferos que contienen secuencias de escalera mayores a 200 nucleótidos en longitud. De hecho, las escaleras del mRNA del ODC de ratón, rata y humano tiene casi 300 nucleótidos de largo.

Los análisis realizados al mRNA del ODC en mamíferos revelaron que el extremo es extremadamente rico en GC, particularmente en su porción 5', y puede formar estructuras secundarias con una alta energía libre de estabilización. Esta región también contiene un ORF pequeño.

Sin embargo, los nucleótidos que franquean el sitio de inicio de la transcripción no conforman perfectamente la secuencia del consenso por el modelo detallado para la iniciación, haciendo que la traducción de este ORF sea distinta.

La proporción incrementada de síntesis de ODC, después de un estímulo de crecimiento, es parcialmente debida al gran incremento en la cantidad de mRNA del ODC.

Los análisis nucleares de transcripción indican que el incremento en la transcripción de ODC, cuenta para la inducción mitogénica de mRNA del ODC. Sin embargo, como ya se mencionó, la acumulación andrógeno-inducida de mRNA del ODC no puede contarse como un incremento en la transcripción del gene. Esto es debido aparentemente, a un efecto principal en el procesamiento de mRNA y/o en su desdoblamiento (64).

Kahana y Nathans (86) demostraron que el mRNA de la ODC fue elevado en restos de fibroblastos en respuesta a un estímulo del crecimiento y que esta inducción no requiere una síntesis de proteínas previa. Otros genes que muestran una respuesta primaria similar a estímulos de crecimiento codifican un grupo interesante de proteínas reguladoras que es compuesto, en parte, por un número de productos proto-oncogénicos (87, 88).

Con muchos de estos genes de respuesta primaria, las vidas medias, tanto de sus proteínas como sus productos de mRNA son muy cortas, siendo del orden de minutos. Como la proporción de aproximación de una célula macromolecular a un nivel nuevo en un estado estable depende únicamente de su vida media (89), los productos celulares de estos genes son capaces de excursionar rápidamente en respuesta a rangos alterados de transcripción (85).

En el caso particular de la ODC se da una situación interesante, en este caso la proteína se transforma rápidamente, con una vida media del orden de 10 a 20

minutos, mientras que la vida media del mRNA del ODC es más larga, variando de 2 a 5 hr, según el tipo de célula.

Esto significa que las proporciones de cambio en un nivel de proteína de ODC estable dado a partir de cambios en el rango de transcripción, es limitado por la estabilidad del mRNA y que la significancia de la vida media, generalmente corta, de la proteína no es aparente inmediatamente (85).

Tradicionalmente se ha interpretado la corta vida media de la ODC como un facilitador del rápido incremento de la biosíntesis de poliaminas. Además, se ha sugerido que estos niveles elevados de poliaminas son requeridos en el surgimiento inicial de células en respuesta a estímulos tróficos.

En el extremo, este punto de vista dio lugar a la hipótesis (no fundamentada) de que las poliaminas eran moléculas reguladoras que participaban en el control del crecimiento celular y particularmente en la producción de rRNA (90). Sin embargo, en el contexto de esta conjetura, es curioso que se encontrara que la acumulación de las poliaminas por sí mismas sea retrasada en todos los sistemas estudiados.

Por ejemplo, en los linfocitos T (Figura 16) donde esto se ha estudiado con precisión, los incrementos en los niveles celulares totales de poliaminas quedan claramente atrás de la acumulación de mRNA y son considerablemente más lentos que los eventos regulatorios tempranos, incluyendo cambios en la expresión de proto-oncogenes (85).

Además, basados únicamente en la cinética retardada de la acumulación de poliaminas, que es probablemente debida en parte a la lenta interconversión

de pools intracelulares a estos compuestos, debe concluirse que los procesos de crecimiento en los cuales pueden participar niveles elevados de poliaminas, deberían ocurrir mucho después de la activación mitogénica.

Por lo cual, esta es una fuerte razón para cuestionarse el punto de vista tradicional de los mayores atributos regulatorios de la ODC, la corta vida media de su proteína que nace de la necesidad de controlar la producción de moléculas regulatorias esenciales, la cual en su momento actúa tempranamente en el proceso de activación mitogénica.

Por esta razón Morris (85) argumenta que, en este caso las propiedades de la ODC son de singular importancia en el momento de arresto celular y también sugiere que los mecanismos post-transcripcionales de la regulación de ODC son particularmente significantes en la prevención de una sobreproducción de poliaminas cuando las células entran a un estado quiescente.

La proteína ODC:

Las secuencias completas de aminoácidos en la ODC de ratón, rata y de humano han sido deducidas de las secuencias nucleótidas de DNAs y de cDNAs genómicos, conteniendo la región completa de codificación del mRNA del ODC.

Las proteínas codificadas contienen 461 residuos de aminoácidos, tienen una masa molecular de aproximadamente 51 kDa y representan la subunidad de la enzima nativa homodimérica.

Cada secuencia contiene 12 residuos de cisteína, lo cual es consistente con el requerimiento de altas concentraciones de tior para la actividad de la ODC. La identidad completa de las secuencias de aminoácidos de proteínas de ODC en ratón, rata y humano es mayor al 90 %.

En vista de la importancia del papel que desempeña la ODC en el crecimiento y diferenciación celular, no es muy sorprendente que su secuencias de aminoácidos se conserve entre diferentes especies (64).

La rápida proporción de desdoblamiento intracelular de ODC (que puede ser tan corta como de 5 minutos) debe ser explicada por la presencia de dos regiones PEST y su secuencia de aminoácidos. Las secuencias PEST (regiones ricas en aminoácidos P, E, S y T) son características de muchas proteínas con vidas medias intracelulares cortas (< 2 h).

Las dos regiones PEST se encuentran cerca del extremo C de la ODC, y la región más terminal C (la cual tiene la mayor proporción de PEST) puede contar para la inestabilidad intracelular de la enzima.

La ODC del tripanosoma, que es una proteína mucho más estable, se une a esta región PEST (Figura 18) y cuando la ODC de ratón es truncada en el extremo de la C terminal, el desdoblamiento de la enzima se reduce de manera marcada (64).

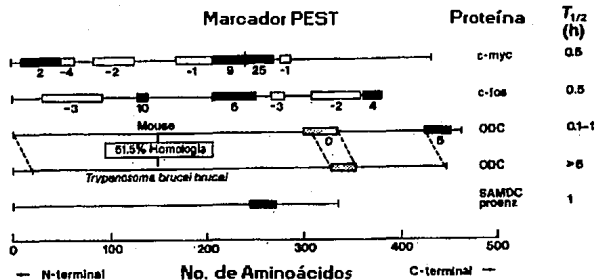


Figura 18: Las posiciones de las regiones PEST en la ODC, SAMDC y algunas otras proteínas con una rápida degradación ($T_{1/2} < 1$ hr). Las regiones PEST fuertes (valores PEST mayores a 0) se muestran en negro. Notar que la ODC del tripanosoma está truncado en el extremo C-terminal, que falta la región fuerte de PEST y que esta enzima es mucho más estable ($T_{1/2} > 6$ hr) (64).

El lento desdoblamiento de la ODC en tripanosomas puede ser la base para la acción selectiva antitripanosoma de la DMFO. El tratamiento con DMFO puede reducir efectivamente el nivel de poliaminas en el parásito, pero no en su anfitrión mamífero en donde la ODC se desdobla rápidamente y donde la ODC irreversiblemente inhibida es continuamente reemplazada por enzima nueva activa.

Sin embargo, también es posible que la formación reducida de tripanotona, un derivado de espermidina actuando como un radical libre, contribuya a la sensibilidad del parásito al tratamiento con DMFO.

La localización del sitio catalítico en ODC no se ha establecido en forma definitiva. Sin embargo, la parte más hidrofílica de la enzima, comprendiendo residuos de 290 - 340, parece ser importante para la actividad catalítica.

El extremo C terminal no es bien conservado y no parece contener porciones críticas del sitio activo. Un ratón deficiente de la terminal C de 38 aminoácidos de ODC todavía tiene la mayoría de la actividad de la enzima nativa, pero si se remueven 7 aminoácidos más de la terminal C permanece solamente una pequeña actividad.

La concentración celular de poliaminas produce una regulación por retroalimentación negativa en la síntesis de ODC, determinada por medición de la incorporación de S-metionina a la proteína. Este efecto parece ser producido principalmente por el nivel de transcripción de ODC, debido a que no hay ninguna carga en el contenido de mRNA del ODC y que solamente existe una pequeña carga en el rango de degradación de la ODC.

Estos descubrimientos han sido corroborados en varios estudios de transcripción de mRNA de la ODC en sistemas libres de células.

Como los lisados de reticulocitos contienen altas concentraciones de poliaminas, existe un incremento en la proporción de transcripción de mRNA de la ODC sobre la reducción de la concentración de poliaminas por filtración en gel, y una disminución sobre la adición de poliaminas.

En base a experimentos recientes, se ha sugerido que el efecto mediado por poliaminas en la expresión de ODC, se da en vez de un fenómeno post-translacional.

También se ha sugerido que el rápido desdoblamiento de la proteína de la ODC llega a ser significativo cuando cesa el crecimiento celular y expiden una regulación para bajar las concentraciones de la enzima, que es importante para prevenir una sobreproducción de poliaminas, lo cual resultaría en citotoxicidad en las células involucradas.

Aunque se ha estudiado intensamente la activación mitogénica de la activación de la expresión de la ODC, apenas se conocen los mecanismos de control de la regulación para disminuir la biosíntesis de poliaminas durante el crecimiento celular animal (85).

Regulación de la ODC:

Es interesante el contraste en el comportamiento de la ODC con otros genes que muestran una respuesta primaria a factores del crecimiento, como el *c-myc*, la familia *jun*, la familia *fos* y el *egr1/zif268*.

Estos genes codifican para factores de transcripción, los cuales actúan fisiológicamente por expresión regulatoria de otros genes que funcionan a lo largo de los procesos de activación mitogénica y de progresión del ciclo celular.

Los genes inmediatos tempranos están "equilibrados por acción", en estos casos donde se ha examinado, las vidas medias tanto para los mRNAs como para los productos de proteínas son del orden de unos cuantos minutos, permitiendo cinéticas de inducción extremadamente rápidas.

Esto presumiblemente se debe, a que los productos de estos genes requieren actuar tempranamente en procesos mitogénicos. En contraste, una inducción pico de mRNA del ODC es más tardía que la mayoría de los otros genes de respuesta primaria.

Como la transcripción de ODC es activada tan temprano como el *c-myc*, el retraso en la respuesta pico de mRNA del ODC no parece ser a nivel transcripcional, lo cual puede deberse, por lo menos en parte a la larga vida media del mensaje ODC.

Esta acumulación más gradual del mRNA de la ODC, relativa a los productos de otros genes de respuesta primaria, parecen consistentes con la evidencia mencionada anteriormente indicando que los productos de la actividad de ODC, las poliaminas, no son requeridos en las células activadas mitogénicamente hasta cerca de un día después de los eventos activadores iniciales.

Si el mRNA de la ODC se acumula de manera relativamente lenta entre las especies de mensajes tempranos, y si se necesitan que se conocen, parece ser que la interpretación inicial de que esta corta vida media permite el rápido incremento de la actividad no es correcta, ya que el rango de inducción de la ODC a un nuevo estado estable es limitada por la estabilidad de su mRNA.

Si no se requiere para la inducción, la inestabilidad de la proteína ODC podría ser importante para la regulación baja de la actividad de la enzima. Como ya se mencionó las células han desarrollado esquemas elaborados para prevenir la sobreproducción de las poliaminas potencialmente citotóxicas.

Una extensión de esta lógica sugiere que si la extremadamente corta vida media de la proteína ODC no es importante para la cinética de su inducción durante la activación mitogénica, puede requerirse enzima activa para una rápida extinción cuando cese el crecimiento.

Debido a la larga vida media de su mRNA, una regulación baja abrupta de la actividad de la ODC durante el crecimiento involucrado podría resultar solamente a partir de procesos regulatorios post-transcripcionales como los discutidos anteriormente.

Estos procesos pueden partir como un resultado directo de la remoción del estímulo mitogénico (o de exposición de las células a estímulos de crecimiento negativos) o también como un resultado de inhibición por retroalimentación cuando las poliaminas comienzan a acumularse en las células involucradas.

Estos posibles mecanismos de baja-regulación de la biosíntesis de poliaminas en células involucradas en crecimiento no se han examinado lo suficiente, pero parece ser que este aspecto de la regulación de ODC es por lo menos tan importante desde un punto de vista biológico como su inducción y debe ser estudiado detalladamente (85).

S-ADENOSILMETIONINA DESCARBOXILASA

La S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) es una enzima que depende del piruvato como cofactor. Se han obtenido preparaciones homogéneas de SAMDC a partir de Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, hígado de rata, músculo de rata, hígado de ratón, glándula mamaria e hígado bovino.

También se han reportado purificaciones parciales y caracterizaciones de la enzima de otras fuentes que incluyen plantas (95). Sus propiedades varían con la forma de obtención. (Tabla 6).

Tabla 6: Propiedades de la SAMDC aislada de distintas fuentes.

FUENTE	PM	PM SUBUNIDAD No. SUBUNIDAD	ACTIVADORES	Km (μ M)
<u>E. coli</u>	108,000	17,000 (6)	Mg ⁺ , Ca ⁺⁺ , Mn ⁺⁺	60
<u>S. cerevisiae</u>	88,000	41,000 (2)	Putrescina	151
Hígado de rata	68,000	32,500 (2)	Putrescina	50

La SAMDC proveniente de mamíferos contiene una subunidad PM de aproximadamente 32,000 y está normalmente presente como un dímero de PM de aproximadamente 65-70,000, aunque en ocasiones se forman agregados más grandes.

La SAMDC proveniente de S. cerevisiae es también un dímero con una subunidad PM de aproximadamente 41,000, pero la enzima proveniente de E. coli tiene seis subunidades de PM 17,000.

Se ha demostrado que la SAMDC obtenida de *E. coli*, levaduras y de hígado de rata contiene un piruvato unido covalentemente el cual es esencial para la actividad de la enzima. Presumiblemente este residuo de piruvato forma una base de Schiff con el sustrato y esto facilita la descarboxilación (95).

Aunque las primeras determinaciones de piruvato en la SAMDC mostraron solamente una molécula de piruvato, por molécula de enzima, en preparaciones recientes producidas por medios más drásticos de aislamiento se determinó una molécula de piruvato por subunidad y tiene 5-6 veces mayor actividad (95).

También se han realizado investigaciones de la estereoquímica y los efectos cinéticos de isótopos en la descarboxilación de la SAMDC y se ha demostrado que la reacción se lleva a cabo con retención de la configuración en el C 1 y el efecto de un isótopo de tritio de 4.5 (95).

Las isoenzimas son activadas por putrescina e inhibidas por SAMDC y por metilglicoxal bis-(guanilhidrazona), en todos los vertebrados superiores y en varios tipos de levaduras (64). La activación es un paso importante en el mecanismo de regulación, que asegura que la síntesis de la adenosimetionina descarboxilada se incremente en respuesta a una mayor disponibilidad de putrescina.

Así mismo, un incremento en la actividad de la ODC produce a su vez, un incremento en la síntesis de espermidina (Figura 16).

En forma similar, las poliaminas espermidina y espermina, más que la putrescina, son las poliaminas predominantes en este tipo de organismos, también cuentan con una SAMDC activada por putrescina.

Ya que la presencia de esta última se correlaciona con la capacidad de sintetizar espermina (la cual no está presente en muchos microorganismos en condiciones normales), pero la generalidad de esta correlación no se ha establecido por completo.

La putrescina como activadora de la SAMDC, puede ser reemplazada parcialmente por una gran variedad de otras diaminas aunque éstas no sean tan potentes. Esta activación es pH dependiente y es considerablemente mayor a un pH de 6.5 que a uno de 8.5.

Por otra parte, existen reportes recientes que indican que la espermidina es capaz de activar a la SAMDC, pero no se ha podido confirmar con espermidina altamente purificada y la enzima homogénea.

Una menor cantidad de SAMDC activada por espermidina puede estar presente en extractos crudos y podría explicar los resultados obtenidos recientemente, pero otra explicación es que la putrescina u otra diamina fue un contaminante de la espermidina utilizada en la activación.

Tal como la ODC, SAMDC es rápidamente inducida con varios estímulos de crecimiento (64) y se encuentra en tejidos en bajas concentraciones, equivalentes al 0.015 % de la proteína soluble en próstata ventral y a 0.0007 % en hígado. Su actividad está regulada por hormonas y por estímulos que

promueven el crecimiento (1). Esta enzima puede ser un factor limitante en la síntesis de proteínas (64).

No se han encontrado inhibidores irreversibles (tan efectivos como DMFO para ODC) que puedan ser usados para influenciar el metabolismo de las poliaminas por inhibición específica de esta enzima (ver capítulo de Inhibición).

Gene de la SAMDC :

Se han aislado e identificado las secuencias de clonas de cDNA que codifican a SAMDC en tejidos bovinos, humanos y de ratas, también se han aislado e identificado las secuencias de SAMDC genómica de levaduras.

Los análisis de southern blot indican que existen múltiples genes para la SAMDC en células de ratas y ratones. También se sabe que más de uno de estos genes son activos.

Las células humanas tienen un número más limitado de genes SAMDC. Las secuencias correspondientes a SAMDC, se localizan en los cromosomas humanos 6 y X. Sin embargo, todavía no se sabe si ambos representan genes activos, o si uno de ellos es un pseudogene.(64)

mRNA de la SAMDC :

Se han realizado estudios por northern blot en tejidos humanos, bovinos, ratas y ratones, utilizando cDNAs que codifican para SAMDC, los cuales han revelado dos secuencias de mRNA con tamaños de 1.7 - 2.4 y de 3.0 - 3.6. Como para

ODC, la diferencia en el tamaño puede deberse a una diferente utilización de dos señales de poliadenilación en el mismo gene.

Así, las especies con mRNA pequeño tienen un extremo 3' no-traducido con 557 nucleótidos, y otro más largo con una extensión de 1.3 kb en el extremo 3'.

Las secuencias de cDNAs de SAMDC demuestran una fuerte homología con menos del 6 % de diferencia en su secuencia codificada. Los resultados de la mayor extensión demuestran que el mRNA de SAMDC de la rata tiene un extremo 5' no-traducido con aproximadamente 320 nucleótidos.

Aunque esta secuencia no es completamente conocida, el extremo de mRNA de SAMDC, como la de mRNA de ODC, parece también ser rico en GC, y también probablemente pueda formar estructuras secundarias. Además de la ORF larga (99-1002 nucleótidos) que codifica para la enzima SAMDC, también existe una ORF más corta (372 nucleótidos) hacia abajo, empezando nueve bases después que el codón final.

No se conoce si esta secuencia (que puede codificar para una proteína con 124 - 125 aminoácidos) se traduce "in vivo". Sin embargo, la secuencia que flanquea el sitio de inicio de transcripción colocativo en el mRNA de SAMDC concuerda, al menos en parte con el modelo propuesto.(64)

La proteína SAMDC :

En contraste con la ODC, la SAMDC no es dependiente del fosfato 5' de piridoxal como cofactor, pero cuenta con un piruvato unido covalentemente como un grupo protético.

SAMDC es el único ejemplo en mamíferos de un pequeño grupo conocido de enzimas que contiene unido piruvato. La formación del piruvato es mejor conocido por la histidina descarboxilasa en el Lactobacillus. Esta enzima es sintetizada como una proenzima que es partida en una unión serina-serina dando la cadena α que contiene piruvato y la cadena B libre de piruvato como la enzima activa.

La molécula de piruvato en SAMDC de E. coli es producida por partición de una ligadura péptica de Hisina-serina. La SAMDC de mamíferos es sintetizada también como una proenzima inactiva de 38 kDa conteniendo de 333-334 aminoácidos, y es entonces partida en un sitio desconocido produciendo dos polipéptidos (de 32 y 6 kDa).

La partición presumiblemente genera piruvato a partir de un residuo interno de serina. El piruvato se localiza aparentemente en la terminal N de la subunidad más larga. Investigaciones utilizando preparaciones purificadas de SAMDC de mamífero solamente han revelado una subunidad de 32 kDa.

Sin embargo recientemente se demostró que el polipéptido más pequeño también es una subunidad de la enzima activa. Esta subunidad es precipitada

con un anticuerpo contra la enzima pura, y contiene una secuencia idéntica a la secuencia encontrada en SAMDC pura de bovino.

La enzima nativa parece ser heterotetramérica, conteniendo dos subunidades pequeñas y dos largas; SAMDC que también se desdobra rápidamente, contiene una región PEST fuerte (Figura 18) con residuos de 243 - 269, en la subunidad más larga.

Se ha demostrado también que la estimulación de crecimiento causa una actividad incrementada de la SAMDC en muchos sistemas experimentales, debido a incrementos tanto en el rango de síntesis como en la vida media de la enzima.

Se han utilizado clones de cDNA que codifican para SAMDC de rata y bovina, como pruebas para analizar la expresión del gene de SAMDC más profundamente. La proporción de síntesis de SAMDC incrementada se determinó como consecuencia de un incremento en el contenido de mRNA de SAMDC y en la eficiencia de la translación.

El incremento en la eficiencia de translación parece aumentar a partir de un incremento selectivo en la proporción de iniciación, permitiendo codificar mRNA de SAMDC a más ribosomas por polsoma.

La síntesis de SAMDC en lisados de reticulocitos es inhibida más intensamente por la adición de poliaminas que por la síntesis de proteínas en sí, indicando que la proporción de translación de mRNA de SAMDC es dependiente de la concentración de poliaminas. De hecho, un estudio reciente proporciona

evidencia de un control de la translocación celular de SAMDC en la célula mediada por polilaminas.(64)

Regulación de la SAMDC:

Se ha observado que muchos estímulos producen cambios substanciales en la SAMDC de mamíferos. Pero aún en un máximo estado de inducción, la proteína sólo está presente en niveles de aproximadamente 1 parte en 10,000 de proteína soluble, esto ha promovido los estudios de la bioquímica de esta inducción.

Sin embargo, se han producido anticuerpos monoespecíficos contra la SAMDC de rata, ratón y bovino. Se han utilizado antiseros de las enzimas de rata y ratón para demostrar el aumento de actividad de la SAMDC durante la regeneración de hígado, crecimiento prostático inducido por andrógenos y después del tratamiento con MGBG (se explica en el capítulo de inhibición) lo cual se explica por un incremento en la cantidad de enzima proteica más que por cambios en la actividad catalítica de una cantidad de proteína determinada.

Se empleó el antisuero de la enzima bovina y el aislamiento de la enzima después de marcarla con aminoácidos radioactivos para demostrar la proporción de síntesis de la SAMDC, la cual se incrementó 10 veces en linfocitos bovinos después de su activación mitogénica.

Parece ser, aunque no se ha comprobado, que se han medido otros cambios en la actividad de la SAMDC "in vitro" en ensayos a concentraciones de

saturación de putrescina, los cuales son también debidos a alteraciones en la cantidad de enzima protéica. Además del cambio en el contenido de enzima protéica, se observaron alteraciones en la concentración de putrescina en la célula que influenciaron la extensión a la cual la SAMDC es activada "in vivo".

La mayoría de los estímulos que incrementan la cantidad de SAMDC, también incrementan la actividad de la ODC (Figura 6) y por lo tanto la cantidad de putrescina presente que activa a la SAMDC, en esta forma, la actividad de la SAMDC "in vivo" es incrementada por medio de ambos mecanismos.

La SAMDC tiene una vida media muy corta en células de mamíferos. Lo cual se demostró en un principio, por el uso de ciclohexilamida para bloquear la síntesis de proteínas que resultó en una rápida disminución de la actividad de SAMDC.

Estudios más recientes, utilizando anticuerpos, mostraron en una forma más contundente, que esta pérdida se debe a la disminución de la enzima protéica y que en el hígado de rata la vida media de la SAMDC es de aproximadamente una hora.

Cuando se administró MGBG la actividad fue medida después de una diálisis para remover al inhibidor.

Este incremento, aparentemente paradójico en la actividad producida por el inhibidor se explica por la estabilización de la enzima contra la degradación proteolítica y la vida media es incrementada por MGBG por lo menos en orden de magnitud.

El MGBG, como inhibidor irreversible también causó una estabilización y un incremento en la cantidad de proteína SAMDC, pero en este caso la proteína medida por inmunoquímica, fue enzimáticamente inactiva aún después de una extensa diálisis.

La corta vida media de la SAMDC permite un rápido cambio en el nivel de proteína como respuesta a los inductores. También es posible que inductores fisiológicos puedan, como el agente farmacológico (MGBG) incrementar la cantidad de enzima protéica por medio de la estabilización de la proteína.

Existe evidencia que esto ocurre durante las 24 hr posteriores a la activación mitogénica por linfocitos cuando la vida media se incrementa de 80 a 170 min.

También pueden ocurrir pequeños incrementos (dos veces) en la actividad de la SAMDC en respuesta a una inducción en la disponibilidad de metionina.

Este efecto también es mediado al doblar la vida media de la enzima y puede ser secundario a cambios generales en la proporción de interconversión de proteína bajo condiciones de eliminación de aminoácidos.

Otros cambios más sorprendentes en los niveles de SAMDC, se obtuvieron por alteraciones en el contenido de poliaminas y se ha establecido que los niveles de SAMDC son regulados por la concentración intracelular de espermidina, ya que cuando el contenido de espermidina es alto, la SAMDC es reprimida y viceversa.

Esta conclusión ha sido formulada en base a dos aproximaciones experimentales: La administración de espermidina o sin-noespermidina a ratas, reduce la actividad de SAMDC en extractos tisulares.

Se observó que el efecto fue mayor en el diafragma y en músculo esquelético que parecen tener formas diferentes de la enzima que el hígado, pero todos los tejidos fueron afectados en mayor o menor proporción, con excepción del corazón.

Por el contrario, cuando la síntesis de poliaminas es inhibida por un inhibidor de ODC, DMFO (Figura 6) o el inhibidor de espermina sintasa, AdoDATO (Figura 6) los niveles de espermidina caen y los niveles de AdoDATO aumentan.

Esto implica que la regulación de SAMDC también puede ser llevada a cabo por la represión de putrescina o espermina, pero los experimentos con AdoDATO indican, como se propuso originalmente, que la espermidina es la molécula regulatoria clave, ya que permite un incremento tanto en la putrescina como en la espermina y una disminución notable en la espermidina. El descenso de la espermidina es paralelo al incremento en la SAMDC.

El mecanismo por el cual la espermidina reprime a SAMDC no se ha entendido por completo, pero parece ser que por lo menos en parte esto involucra cambios en la proporción de degradación de esta enzima. La vida media de SAMDC se reduce en animales o células tratadas con espermidina y se incrementa en células en donde la espermidina es reducida por DMFO.

Se ha propuesto un modelo hipotético en el cual el sustrato de la degradación es un complejo espermidina-SAMDC. Este modelo podría explicar la estabilización por MGBG por medio de sí misma, ya que tiene similitudes estructurales con espermidina y puede remover a la espermidina de este complejo.

El control negativo de SAMDC por espermidina tiene una importante consecuencia farmacológica: Cuando los niveles de espermidina y putrescina son reducidos por DMFO, existe un incremento en la cantidad de SAMDC que permite una producción incrementada de adenosilmetionina descarboxilada. (A mayor incremento en el contenido de la enzima, mayor es la compensación por la pérdida del activador, putrescina).

No se conocen otras reacciones metabólicas de la adenosilmetionina descarboxilada, más que la síntesis de espermidina y espermina (Figura 6). En ausencia de putrescina y espermidina, estas reacciones no pueden realizarse y por lo tanto, se acumula la adenosilmetionina descarboxilada. Como consecuencia, en células mamíferas tratadas con DMFO se da un incremento de 500 veces en el contenido de adenosilmetionina descarboxilada.

Aunque también es posible que el alto nivel de adenosilmetionina descarboxilada contribuya a la inhibición de crecimiento atribuida al DMFO.

Alternativamente, la alta concentración de adenosilmetionina descarboxilada básica puede sustituir una poliamina y el gran exceso de este nucleótido asegura que la pequeña cantidad de putrescina producida en presencia de DMFO se convierta en espermina.

El contenido de espermina no disminuye por la presencia de DMFO en la mayoría de las células. De forma similar, la AdoDATO causa un sorprendente incremento en la adenosilmetionina descarboxilada por la re-disminución de SAMDC y en su oportunidad permite un aumento en las concentraciones de espermina.

Es aparente que se necesita determinar el potencial de los Inhibidores potentes y específicos de la SAMDC disponibles actualmente y discernir la interrelación entre el metabolismo de nucleótidos y la biosíntesis de poliaminas.(95)

ESPERMIDINA SINTASA Y ESPERMINA SINTASA

Estas enzimas son mucho más estables que la ODC y SAMDC. La espermidina sintasa es un homodímero con una subunidad molecular y una masa molecular de aproximadamente 36 kDa.

La espermina sintasa está formada por dos subunidades con una masa molecular de 44 kDa, las actividades de estas enzimas dependen de la disponibilidad de su sustrato específico (5).

A diferencia de las sintetetas, las sintetas son enzimas que no requieren de energía liberada en la hidrólisis de un enlace pirofosfato para realizar su función de síntesis.

La espermidina sintasa y la espermina sintasa son expresadas en forma consecutiva y son mucho más estables que la ODC y que la SAMDC.

La espermidina sintasa es un homodímero con una subunidad de masa molecular de aproximadamente 36 kDa. La espermina sintasa consiste de dos subunidades con una masa molecular de 44 kDa.

Estas enzimas tienen aparentemente valores de K_m para SAMDC de 0.1 - 1.1 μM y putrescina/espermidina de 40 - 100 μM , que están cerca de las concentraciones observadas en los tejidos (64).

ESPERMIDINA/ESPERMIDINA N¹-ACETILTRANSFERASA

Se conocen dos poliaminas acetilasas: una es una enzima predominantemente nuclear que actúa principalmente sobre las histinas y puede acetilar espermidina para formar N-8-acetil-espermidina, que posteriormente es desacetilada en la célula.

El objeto de este procedimiento todavía no es muy claro, pero se piensa que este método constituye un medio para remover la espermidina excedente en el núcleo celular.

La otra enzima es la espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa, que es citosólica y puede diferenciarse de la acetilasa nuclear por medio de reacciones con anticuerpos específicos y por reacciones de inhibición, dada la diferencia en la respuesta ante inhibidores.

La enzima tiene un peso molecular de 115,000 y está formada por dos subunidades.

La espermidina forma N¹-acetil-espermidina acetila la espermina formando N¹-acetil-espermidina, que a su vez puede ser acetilada nuevamente por la enzima y formar N¹-N¹² diacetil-espermina, pero este compuesto no ha sido detectado "in vivo". Esta enzima es altamente específica y solamente acetila sustratos con una estructura R-N₂H-(CH₂)₃NH₂, esta es la razón por la que no es capaz de formar N-acetil-espermidina (3, 4).

POLIAMINO OXIDASAS

Las poliamino oxidasas son enzimas que se clasifican en función del grupo amino con el que reaccionan de la siguiente manera:

- 1) Amino oxidasas que actúan con grupos amino primarios.
- 2) Amino oxidasas que actúan con grupos amino secundarios, p.e. sobre grupos propilamina de la espermidina y espermina.

La poliamino oxidasas proveniente de plasma bovino tiene la capacidad de actuar sobre la espermidina y espermina para producir un aminomonoaldehído (N^1 -(4-aminobutil)-aminopropanal) o un dialdehído (N , N^1 -bis-(3-propionaldehído)-1,4-diaminobutano), amoníaco y peróxido de hidrógeno, respectivamente (Figura 19).

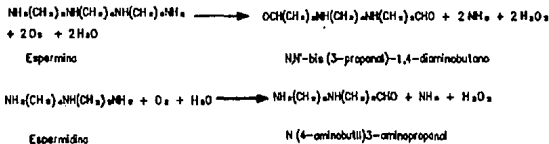


Figura 19: Oxidación de espermina y espermidina por poliamino oxidasas aisladas de plasma bovino.

La poliamino oxidasas es una glicoproteína con un PM cercano a 180,000, las dos subunidades que la forman están unidas no covalentemente y cada

subunidad está constituida por un puente disulfuro, dos átomos de cobre y un grupo carboxilo.

Existe otra poliamino oxidasa que actúa sobre las poliaminas que es aislada de hígado de rata, esta enzima es un polipéptido con un PM de 60,000, utiliza como cofactor FAD y probablemente hierro, se sabe que actúa sobre los grupos amino secundarios de la espermina o espermidina produciendo 3-aminopropanal (Figura 20).

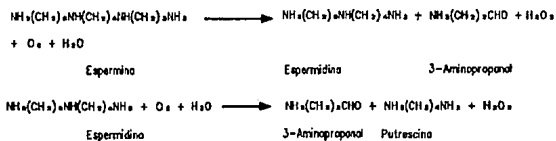


Figura 20: Oxidación de espermina y espermidina por poliamino oxidasa aislada de hígado de rata.

Se encuentra en concentraciones similares a los de la espermidina y espermina sintasa y excede a las concentraciones normales de la espermina y espermidina N¹-acetiltransferasa (3).

REGULACION POR RETROALIMENTACION DE LA SINTESIS DE POLIAMINAS

La estimulación del crecimiento celular causa una rápida inducción en la expresión de los genes de ODC y de SAMDC. Esto, combinado con las proporciones excepcionalmente rápidas del desdoblamiento de estas enzimas biosintéticas de poliaminas, provee a la célula de un rápido medio de regulación de las concentraciones de poliaminas.

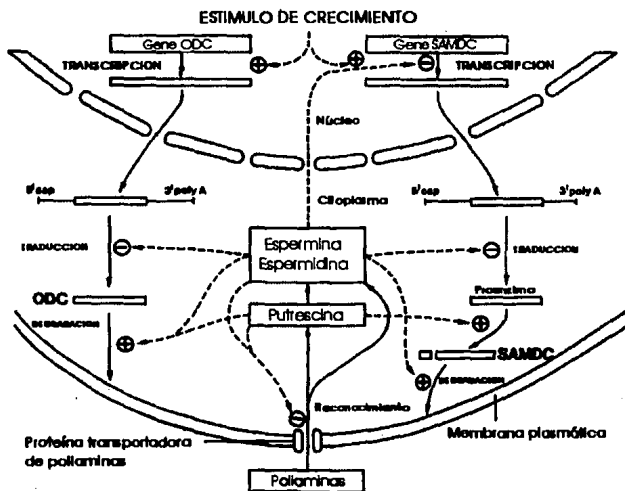


Figura 21: Regulación del contenido de poliaminas en células de mamíferos (64).

Por otra parte, las poliaminas también ejercen un control por retroalimentación de su propia síntesis, a nivel transcripcional, translacional y post-translacional (Figura 21).

Parece existir una relación recíproca entre el rango de transcripción del mRNA de la ODC y la concentración de espermina y espermidina. Como se mencionó anteriormente, el mRNA de la ODC tiene un extremo líder 5' no-traducido, que es altamente rico en GC y tiene una fuerte tendencia a formar estructuras secundarias.

Se ha especulado que este extremo está involucrado en la regulación translacional de la ODC ya que la formación de estructuras secundarias en esta región puede interferir con la transcripción del mRNA de la ODC y esta formación puede ser afectada en forma directa o indirecta por poliaminas.

Este mecanismo podría implicar que el control de la síntesis de ODC mediado por poliaminas, es ejercido principalmente en la fase de iniciación. Sin embargo, el hecho de que el número de ribosomas asociados con cada molécula de mRNA de la ODC no es afectado por el nivel de poliaminas, indica que existen otras formas de control.

Los estudios de eliminación realizados recientemente, indican que el extremo no desempeña un papel principal en el proceso actual de regulación.

La síntesis de la proenzima SAMDC también es inhibida por altas concentraciones de espermidina y espermina. Además de estar involucradas en el mecanismo de control translacional, estas aminas ejercen un efecto a nivel del estado de permanencia del mRNA de la SAMDC.

También podemos encontrar un extremo 5' líder no-traducido en el mRNA de SAMDC que puede estar involucrado en el control translacional de la expresión de SAMDC. Otro posible sitio regulador de poliaminas, es la conversión de la proenzima SAMDC en subunidades de 6 y 32 kDa de la enzima activa. Esta conversión parece ser estimulada por putrescina.

La degradación de ODC y de SAMDC es sujeto de control por las poliaminas. La espermina y espermidina estimulan la degradación de ambas enzimas, mientras que la putrescina solamente afecta a la ODC.

El mecanismo molecular para esta degradación mediada por poliaminas aún no ha sido determinado.

Sin embargo, se ha demostrado que las poliaminas inducen la síntesis o la liberación de una proteína de 22 kDa que inhibe a la ODC, llamada antienzima, que se une no covalentemente a la ODC, esta unión (y el consecuente efecto inhibitorio) de la antienzima a la ODC es extremadamente fuerte ya que tiene una constante de equilibrio muy alta ($1.4 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$).

Debido a que el contenido de proteína ODC decrece más rápidamente después de la exposición a poliaminas que después de la inhibición de la síntesis proteica por ciclohexamida, la antienzima puede actuar como un sistema blanco para la degradación de ODC.

Los niveles celulares de poliaminas son normalmente una función de sus proporciones de síntesis. Sin embargo, en casos en los que su síntesis es afectada, ya sea debido a falta de sustratos o a la presencia de inhibidores, las

células tienen un sistema específico de transporte para la utilización efectiva de poliaminas extracelulares.

La actividad de este sistema parece ser negativamente regulado por las mismas poliaminas (Figura 21).

La importancia del sistema de suministro de poliaminas es evidente a partir de un estudio en el que se demostró que tumores experimentales utilizaban este sistema como un mecanismo de rescate para compensar la deficiencia de poliaminas.

De acuerdo a lo anterior, se encontró que la prevención del suministro de poliaminas potencia el efecto terapéutico de un inhibidor de la ODC, resultando en una significativa mejoría en los animales tratados.

**INTERACCIONES ENTRE CICLO DE LA UREA,
BIOSÍNTESIS DE POLIAMINAS Y CICLO DE ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS (KREBS)**

CICLO DE LA UREA:

El ciclo de la urea consiste en cinco pasos principales (Figura 22):

- 1) Síntesis de carbamolfosfato a partir de iones bicarbonato y amonio.
- 2) Formación de citrulina a partir de ornitina y carbamolfosfato.
- 3) Síntesis de argininosuccinato a partir de citrulina y aspartato.
- 4) Hidrólisis de argininosuccinato con formación de arginina
- 5) Degradación de arginina con formación de urea y ornitina.

Al finalizar el ciclo, la ornitina formada está disponible para utilizarse en el paso 2 del ciclo o para la biosíntesis de poliaminas y la urea es excretada.

Los dos pasos iniciales son catalizados por dos enzimas mitocondriales, la carbamolfosfato sintetasa I y la ornitina transcarbamilasa, y los tres siguientes por enzimas citoplasmáticas: argininosuccinato sintetasa, argininosuccinasa y arginasa, respectivamente.

Estas enzimas están presentes en el hígado, intestino y riñón, pero sólo las concentraciones a las que se encuentran en el hígado son suficientes para que se realice la ureogénesis hepática. La síntesis de argininosuccinato es un paso importante en la interacción del ciclo de la urea con el ciclo de Krebs ya que

El aspartato formado contiene el segundo grupo amino destinado a la síntesis de la urea. El fumarato que se obtiene por hidrólisis de argininosuccinato por argininosuccinasa, regresa al ciclo del ácido cítrico y en esta forma la arginina queda disponible para la síntesis de proteínas en tejidos extrahepáticos o para continuar con el ciclo de la urea en el hígado.

La arginasa efectúa la conversión de arginina en urea y ornitina y así se completa el ciclo.

En algunos tejidos extrahepáticos solamente se llevan a cabo los tres últimos mecanismos enzimáticos del ciclo de la urea, por ejemplo: en cerebro y músculo ya que la biosíntesis de urea depende del aporte hepático de citrulina.

La función del ciclo de la urea es la captación de grupos amino a partir de aminoácidos, siendo este un proceso anabólico con requerimiento energético. Este ciclo permite la formación de los esqueletos de carbono que son necesarios para el metabolismo oxidativo (1).

Las concentraciones de poliaminas se incrementan de manera marcada en el hígado de rata en regeneración, en estas circunstancias se observa un incremento en la actividad de las enzimas involucradas en su biosíntesis (52, 53).

Después de una hepatectomía parcial se produce un intenso crecimiento celular y un incremento en la concentración de ODC, que alcanza un pico dentro de las 4 horas posteriores a la intervención (53).

Brebnor, et.al., determinó la actividad enzimática en el ciclo de la urea en las primeras 24 horas de la regeneración hepática. Por otra parte, en las primeras etapas de regeneración en animales sometidos a una dieta normal los resultados indicaron una sorprendente disminución en los niveles de las cinco enzimas involucradas en el ciclo de la urea, alcanzando niveles mínimos dentro de las 4 horas posteriores a la intervención, este descubrimiento es consistente con el incremento de ODC (52).

Con este estudio se demostró una regulación concertada de las cinco enzimas. Lo que a su vez sugiere que la actividad de esta vía metabólica puede competir con la ODC por la ornitina y coincide con el incremento de ornitina hepática y amonio en plasma durante este período (53).

La vía metabólica que sigue la ornitina depende de los requerimientos orgánicos.

CICLO DE KREBS:

La función del ciclo de Krebs es proveer al ciclo de la urea del aspartato necesario para que junto con citrulina, se sintetice argininosuccinato.

Posteriormente, este último se hidróliza y el fumarato obtenido se incorpora al ciclo de Krebs, mientras que la arginina sigue el ciclo de la urea para formar ornitina y urea, las cuales siguen los mecanismos ya descritos.

ESTA TESIS N° DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Se ha observado que cuando aumenta la síntesis de poliaminas aumenta la actividad de arginasa y que así se incrementa el suministro de ornitina hacia ODC.

Así es como los ciclos se relacionan, dependiendo de las necesidades celulares en un momento dado (Figura 23).

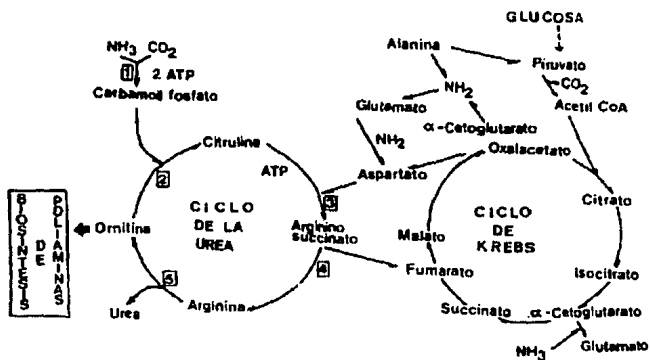


Figura 23:

Interacciones entre el ciclo de la urea, el ciclo de Krebs y la biosíntesis de poliaminas. Enzimas involucradas: (1) Carbamoyl-fosfato-sintetasa, (2) Ornitina transcarbamilasa, (3) Arginina succinato-sintetasa, (4) Arginina succinasa, (5) Arginasa. Los asteriscos indican el origen del nitrógeno ureico (1).

CAPITULO 4

INHIBICION DE LA SINTESIS DE POLIAMINAS

Las pollaminas son constituyentes normales de las células, como ya hemos visto. Cuando las células son despojadas de sus pollaminas, utilizando inhibidores de síntesis altamente específicos, estas dejan de proliferar (64).

Inversamente, cuando a las células despojadas de pollaminas se les administran pollaminas, el resultado es un crecimiento normal. Por estas razones y por las ya descritas anteriormente, es evidente que las pollaminas desempeñan un papel importante en el crecimiento y división celular.

Además del efecto antiproliferativo, los inhibidores de la síntesis de pollaminas inducen diferenciación terminal en ciertos tumores de origen embrionario y tienen un alto poder antiparasitario.

Como ejemplo, tenemos que uno de los inhibidores ha curado pacientes con la enfermedad del sueño africana, y es efectivo en contra del Pneumocystis carinii que es un protozoo oportunista en pacientes con SIDA (64).

El aumento en el conocimiento de los mecanismos que regulan los niveles intracelulares de pollaminas, como los inhibidores específicos y el aislamiento de mutantes deficientes en pollaminas, promete el desarrollo de nuevos fármacos y regímenes antiparasitarios y anticáncer (64).

Muchos procesos bioquímicos, tales como el transporte de nutrientes al interior de una célula, la velocidad de síntesis de diversas macromoléculas y el control de su degradación son influenciados por agentes inductores del crecimiento (1).

En cambios tempranos asociados con la transición de células de un estado quiescente a un estado de proliferación, existe un aumento en las enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas. Como resultado de esta actividad enzimática intensa, hay una acumulación intracelular de poliaminas (1).

Aún cuando la velocidad de síntesis de estos compuestos siempre parece estar acoplada a un aumento de la proliferación celular, todavía está por descubrirse si este incremento es circunstancial o esencial para que las células entren en actividad mitótica (1).

Para esto se ha intentado provocar una deficiencia en la concentración de poliaminas, utilizando inhibidores más o menos específicos de las enzimas que las biosintetizan, así como moduladores de la actividad de ODC análogos de putrescina (1).

Uno de los sistemas más estudiados sobre este aspecto ha sido el hígado en regeneración, en el que actualmente se investiga la relación entre la embriogénesis de los mamíferos y las poliaminas (1).

Como ya mencionamos, la biosíntesis de poliaminas involucra la acción secuencial de dos descarboxilasas y de dos transferasas. Muchos de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas que han sido desarrollados para bloquear la biosíntesis de poliaminas "in vivo", son dirigidos a las descarboxilasas (Tabla 7).

La α -difluorometilornitina (DMFO) es uno de los inhibidores de la ODC más eficientes y su mecanismo de acción es bien conocido.

El desarrollo preferencial de inhibidores de descarboxilasas puede explicarse por dos razones:

1. Se cree que la velocidad de descarboxilación de la ornitina es limitante en la regulación de los pasos biosintéticos de las poliaminas.
Aunque en algunos casos, la síntesis de ornitina podría ser el factor limitante.
2. Los mecanismos catalíticos de las transferasas (espermidina sintasa y espermina sintasa) no han sido bien dilucidados.

Tabla 7: Inhibidores de la biosíntesis de poliaminas (1).

ENZIMA	INHIBIDOR	MECANISMO DE ACCION
Ornitina Descarboxilasa (ODC)	<p><u>Análogos del sustrato:</u></p> <p>A. DL-α-hidracino-ornitina B. DL-α-metil-ornitina C. DL-α-hidracino-etilornitina D. DL-α-difluoro-metilornitina</p> <p><u>Análogos del producto:</u></p> <p>E. Trans-1,4-diamino-2-buteno F. 1,4-diamino-butanona G. 5-hexino-1,4-diamina H. Homólogos de diaminas con 3-12 átomos de Carbono. I. 1,3 diamino-2-propanol</p>	<p>Reversible y competitivo Reversible y competitivo Reversible y competitivo Irreversible</p> <p>Reversible y competitivo Reversible y competitivo Irreversible Indirecto (p.e. inducción de ODC antienzima, proteína inhibidora de ODC) Indirecto</p>
S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC)	<p>A. Methylglyoxal-bis (guanilhidrazona) (MGBG)</p> <p>B. 1,1'-[[metiletano-diideno]dinitilo] bis-(3-aminoguanidina) (MBAG)</p> <p>C. S-adenosil-DL-2-metilmetionina</p>	<p>Reversible y competitivo (con respecto al sustrato)</p> <p>Reversible inicialmente y competitivo con respecto al sustrato. Después Irreversible</p> <p>Reversible y competitivo con respecto al sustrato</p>
Espermidina sintasa	A, γ , ω -diaminas con 3-12 carbonos. El 1,5-diamino-pentano es el más activo	Reversible y competitivo con respecto a uno de los sustratos (putrescina)
Espermina sintasa	A, γ , ω -diaminas con 3-12 carbonos. El 1,5-diamino-pentano es el más activo	Reversible y competitivo con respecto a uno de los sustratos (espermidina)

INHIBIDORES DE LA ODC:

Uno de los inhibidores más utilizados es la 2-difluoro-metilmorfina (DMFO), que es un inhibidor altamente específico e irreversible de la ODC. La especificidad está basada en la activación del inhibidor, catalizada por ODC. Sin embargo, la descarboxilación de DMFO desenmascara un grupo reactivo latente que se une covalentemente al inhibidor en, o cerca de, el sitio activo de la enzima (64).

INHIBIDORES DE LA SAMDC:

El MGBG es un inhibidor competitivo con respecto a la adenosilmetionina y tiene un K^i de menos de $1 \mu\text{M}$, lo cual se ha confirmado en múltiples ocasiones.

Existen también varios congéneres del MGBG, por ejemplo su análogo de etilo EGBG, que actúa como un fuerte inhibidor de la SAMDC y es cinco veces más potente (95).

Otro inhibidor que actúa en forma irreversible, es un derivado del MGBG que tiene grupos amino adicionales en cada extremo, el 1,1'-[(metilenediisobutirilo)bis(3-aminoguanidino)] (MBAG), que aunque es considerablemente más potente como inhibidor de la SAMDC activada por putrescina, es inactivo con la enzima activada por Mg^{+2} o contra las variedades de enzima que no requieren cationes. De hecho, es un buen inhibidor de la enzima de E. coli [K^i de 13 - 20 μM] y del Physoalum polycephalum [K^i de 10 μM] (95).

La EGBG que tiene un K_i de $1.6 \mu\text{M}$ para la SAMDC de *E. coli*, es el inhibidor más potente para esta enzima de los que se conocen hasta ahora (95).

Se ha examinado la capacidad inhibidora de una gran variedad de nucleósidos relacionados a la adenosilmetionina, pero no se ha encontrado uno comparable al MGBG. La parte de adenina y la carga positiva en el centro de sulfonio (que puede ser provisto por un átomo de nitrógeno) son necesarias para la unión en el sitio activo, pero el resto de la porción de aminoácido no es esencial.

El 5-(Dimetilsulfonio) 5'-deoxiadenosina y la adenosilmetionina descarboxilada, fueron los inhibidores más potentes. El hecho de que el compuesto formador que únicamente tiene un segundo grupo metilo unido al centro sulfonio, fue tan activo como la adenosilmetionina descarboxilada contradice la sugerencia de que el grupo aminopropil es esencial para la unión con el sitio activo.

Aunque se forma una base de Schiff entre el piruvato unido a la enzima y la adenosilmetionina a ciertos inhibidores, los derivados de estos compuestos elaborados con piruvato libre no resultaron inhibidores.

Sin embargo, la inactivación irreversible de la SAMDC se produce por adición del sustrato a inhibidores que contienen un grupo amino primario terminal seguido de un clonoborohidrido de sodio. Esto último reduce la base de Schiff formada en el sitio activo.

Estos compuestos, en ausencia del clonoborohidrido de sodio producen una inactivación mucho más lenta, lo cual es lógico por la transaminación del inhibidor.

Aunque es relativamente lenta, la actividad de la enzima tiene una vida media menor a 90 minutos en presencia de 0.2 mM de adenosilmetionina, lo cual puede contribuir a la rápida interconversión de la proteína "in vivo".

No existen reportes que indiquen que los nucleósidos inhibidores de la SAMDC puedan ser usados con éxito en la prevención de la biosíntesis de poliaminas.

Aunque la MGBG ha sido utilizada frecuentemente con este propósito, estos estudios se han complicado con otros efectos adversos de esta sustancia a nivel celular (95), como son: daños mitocondriales que interfieren con el transporte de poliaminas, inhibición de las diamino-oxidasas e inducción de las acetiltransferasas (64).

Estos efectos son provocados por su inespecificidad a la SAMDC ya que es transportada por la misma vía que las poliaminas. Desafortunadamente, la MBAG comparte estos efectos colaterales y es menos estable bajo condiciones experimentales (95).

También existe otro inhibidor de la SAMDC que es la S-metil-5'-hidoadenosina [(AdoS + (CH₃)₂], sin embargo, también inhibe a la espermina sintasa (64).

Recientemente se reportó un inhibidor de las isoenzimas ATP:L-metionina adenosiltransferasa de hígado de rata y del hepatoma sólido de Novikoff: el ácido L-2-amino-4-metoxi-*cis*-but-3-enoico y se determinó que la potencia de este ácido es significativamente más alta que la de sus análogos estructurales, la L-metionina y el ácido L-2-amino-4-metoxi-*trans*-but-3-enoico ya que los valores K_m de la L-metionina son comparables a los de hígado de rata e

Isoenzimas tumorales, por lo que esto sugiere una estrecha correlación entre estas dos moléculas (107).

Aunque actualmente no se cuenta con un inhibidor específico de la SAMDC y no es clara la posibilidad de su descubrimiento, si existe alguno, las acciones antitumorales de MGBG son terapéuticamente apreciables debido a sus efectos en el metabolismo de poliaminas (95).

CAPITULO 5

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS POLIAMINAS

PAPEL DE LAS POLIAMINAS EN EL CRECIMIENTO CELULAR:

Desde el descubrimiento de la ubicuidad de las poliaminas a altas concentraciones intracelulares, se ha dado un gran interés en sus funciones biológicas.

Los estudios genéticos y farmacológicos han demostrado que estos compuestos son esenciales en procesos normales de crecimiento tanto en células procariontes como eucariontes.

En considerables sitios moleculares de acción de poliaminas en células animales, la cinética de la acumulación de poliaminas sugiere un papel tardío para estos compuestos en el proceso de activación mitogénica, posiblemente en la replicación de DNA o división celular (85).

En mutantes de E. coli, donde se ha debilitado la capacidad de producir niveles celulares normales de putrescina y espermidina, el movimiento de la bifurcación en la replicación de DNA es defectuosa (91).

En linfocitos T mitogénicamente activados (Figura 16) bloqueando la acumulación de poliaminas con inhibidores que actúan en dos sitios diferentes en la ruta biosintética, se revelaron efectos menores, cuando había, en la síntesis de RNA o proteína antes de cumplirse 20 hr de la activación y las células iniciaron la replicación de DNA (fase S) al mismo tiempo que aquellas con un complemento de poliaminas normal (85).

En contraste a la entrada normal de las células en la fase S, la replicación de DNA per se fue inhibida en núcleos aislados de células deficientes en poliaminas, reflejando una fase S alargada en comparación con las células intactas.

Aún no se ha resuelto si este comportamiento resulta de un papel directo de las poliaminas en los procesos de replicación, o si estos compuestos están involucrados en la expresión de enzimas específicas de la fase S, que ejercen una influencia indirecta en la síntesis de DNA (92).

Sin embargo, sin tomar en cuenta las funciones detalladas de las poliaminas en el crecimiento celular, es claro que actúan tardíamente en el programa mitogénico. Por lo que parece poco posible que la significancia biológica de la corta vida media de la proteína de la ODC resida en la necesidad de una rápida conversión en la síntesis de poliaminas (85).

CITOTOXICIDAD DE LAS POLIAMINAS

A pesar de la gran utilidad que pueden tener las poliaminas, estas sustancias pueden ser citotóxicas en concentraciones inadecuadas.

Se ha reconocido la influencia tóxica de la espermina en microbios desde hace muchos años. Al menos uno de estos mecanismos de toxicidad parece claro: la exposición de E. coli a altas concentraciones de poliaminas inhibe la síntesis de poliaminas.

Parece ser, que este efecto tóxico se debe a la sustitución de iones de magnesio en sitios críticos en los ribosomas con poliaminas, produciendo una pérdida de la estructura nativa de las dos unidades ribosomales y sus RNAs constitutivos.

En E. coli, tanto la biosíntesis de poliaminas como su metabolismo son de tal forma que previenen la acumulación de concentraciones intracelulares tóxicas de estos cationes. Las dos rutas biosintéticas de putrescina cuentan con un control de producto final, que previene una sobreproducción.

Probablemente es de igual importancia el hecho de que cuando la E. coli crece en una fase estacionaria, toda la espermidina intracelular se convierte en derivados de glutatiónil; y cuando estas células son expuestas a altas concentraciones de espermidina o espermina endógena, se excretan grandes cantidades de derivados acetilados en el medio de cultivo.

Por lo tanto, el metabolismo y la excreción de poliaminas compensan en parte la acumulación intracelular bajo estas condiciones fisiológicas.

En el caso de células animales, los estudios de toxicidad de poliaminas son confundidos por la presencia de poliamino oxidasa en suero bovino presente en el medio de cultivo.

La acción de esta enzima en la espermidina y la espermina da un incremento de acroleína, la cual es altamente tóxica por sí misma y enmascara cualquier influencia tóxica producida por las poliaminas. Por lo cual, la toxicidad de altas concentraciones de poliaminas a niveles intracelulares no ha sido resuelta.

Sin embargo, existen múltiples mecanismos en las células eucariotes que previenen la acumulación de poliaminas a niveles altos. Las poliaminas se degradan en las células animales por acetilación seguida de oxidación.

No se ha establecido si el exceso de poliaminas o sus derivados acetilados pueden ser excretados de las células animales, como las bacterias. No obstante, en Neurospora crassa, la excreción es claramente un mecanismo de gran importancia para despojar a las células del exceso de poliaminas.

Una forma extremadamente importante de prevenir la sobreproducción de poliaminas es la regulación negativa de la ODC por poliaminas, utilizando lo que parece ser un complejo patrón de mecanismos post-transcripcionales.

Un componente de la regulación por retroalimentación del nivel de ODC puede ser al nivel de la iniciación translacional, aunque esta interpretación se

ha cuestionado recientemente. Un mecanismo adicional de regulación negativa de la ODC por poliaminas parece ser a través de la modulación de la estabilidad de la proteína.

Mientras esta forma de control es mediada por vía de la proteína inhibidora, antienzima ODC, no ha sido claramente establecida.

Sin tomar en cuenta los detalles de los mecanismos involucrados, es claro que las células eucariontes tienen múltiples medios de prevenir la acumulación intracelular de los niveles de poliaminas que pueden ser dañinos. Esto sugiere que en células animales, así como en bacterias, deben evitarse las concentraciones inapropiadas de poliaminas (85).

INTERACCIONES CON ACIDOS NUCLEICOS

Se ha descubierto que las poliaminas interactúan con ácidos nucleicos, estabilizando la estructura secundaria del DNA y protegiendo al DNA de la desnaturalización térmica y de la degradación enzimática, por otra parte también regulan la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas (Tabla 8)(1).

Tabla 8: Efectos biológicos de las poliaminas (1).

<p>1. Poliaminas como factores del crecimiento:</p> <ul style="list-style-type: none">- En microorganismos- En células de mamíferos
<p>2. Estabilización de membranas celulares.</p>
<p>3. Estabilización de partículas subcelulares.</p>
<p>4. Asociación con ácidos nucleicos:</p> <ul style="list-style-type: none">- Estabilización del DNA contra la desnaturalización térmica.- Asociación con tRNA.- Estabilización de la forma superenrollada del DNA.- Empacamiento del DNA en bacteriófagos.- Estimulación de la síntesis de DNA y de RNA.- Modificación de la actividad de ribonucleasas.- Estabilización del RNA recién sintetizado.
<p>5. Efectos sobre la síntesis de proteínas:</p> <ul style="list-style-type: none">- Fijación de moléculas de tRNA a ribosomas.- Estimulación de la metilación del tRNA.- Reemplazamiento de Mg^{++} en la reacción de la aminoacil tRNA sintetasa.- Asociación con ribosomas.- Biogénesis de partículas ribosomales.- Iniciación y fidelidad de la traducción.- Estimulación de la nucleotidiltransferasa de tRNA.

6. Efectos sobre reacciones metabólicas:

- Estimulación de nucleótidocinasas.
- Modificación de las actividades de proteincinasas.
- Incremento de la ADP-ribosilación de proteínas nucleares.
- Activación de fosforilasa b.
- Estimulación de la lipólisis.
- Activación de colinacinasas.
- Incremento en la utilización de fructosa en espermatozoides (epidídimo).
- Inhibición de ATPasa.
- Modificación de la actividad de acetilcolina esterasa.
- Inhibición de la agregación de plaquetas.
- Estimulación del metabolismo de estradiol en microsomas de hígado.

La distribución de la carga en una molécula de espermina la hace unirse fuertemente a dos grupos fosfato en cada extremo de la doble hélice de DNA. Por lo tanto la espermina estabiliza la hélice uniendo sus dos extremos (64) e incrementando su resistencia a los agentes separadores de filamentos (62).

También se ha encontrado que las poliaminas pueden causar grandes distorsiones en la forma B normal del DNA, incluyendo transiciones a las formas A y Z. Estos cambios pueden tener consecuencias importantes en la interacción del DNA con proteínas de la célula (64).

Las poliaminas también pueden estabilizar otras estructuras de doble hélice. Además, las poliaminas pueden encontrarse en preparaciones de DNA, ribosomas y tRNA. Probablemente en las bacterias, se encuentran en los ribosomas, ya que la concentración total se aproxima al contenido ribosómico en diferentes condiciones de crecimiento (62).

Aunque la síntesis estable de RNA incluye al tRNA y al rRNA, estos dos no son regulados de la misma forma.

A diversas tasas de crecimiento la concentración de tRNA permanece alrededor del doble de la de DNA y a una décima parte de la concentración de proteínas. Dado que la frecuencia de contacto de cualquier ribosoma con un tRNA es proporcional a la concentración de este último, esta constancia corresponde a la eficiencia de la función ribosómica (62).

Las poliaminas están en gran parte unidas a la célula de los ribosomas y a los tRNA. Cuando la síntesis de RNA se bloquea, la síntesis de poliaminas continúa, pero la relación normal con el RNA se mantiene por la excreción del exceso en forma de derivados acetilados (62).

Las poliaminas son excelentes reguladores de las estructuras secundarias y terciarias de los ácidos nucleicos. No solamente porque las poliaminas promueven las transiciones B/Z y B/A y estabilizan las triples hélices, ya que datos de diversos modelos, cristales y soluciones indican que también estabilizan o crean uniones en los ácidos nucleicos.

Estos cambios conformacionales pueden tener efectos generales y específicos en las funciones de los ácidos nucleicos, afectando a procesos biológicos como condensación de cromatina, fases del nucleosoma, regulación transcripcional y recombinación del DNA.

Además pueden afectar la citotoxicidad de los agentes dirigidos al DNA como las antraciclinas o los agentes alquilantes (93).

La evidencia que se tiene acerca de la especificidad de las poliaminas en las interacciones con DNA por ejemplo, es únicamente circunstancial.

Por una parte las poliaminas pueden ser localizadas en posiciones específicas en una rejilla de cristales y por otra los estudios de modelos diferentes, implican que existen posibilidades de que las interacciones sean estables.

Sin embargo, estudios realizados con soluciones muestran que las poliaminas también pueden interactuar en forma no específica con ácidos nucleicos. La dificultad de esta interacción radica en localizar los sitios de las interacciones específicas entre los sitios de las interacciones no específicas.

Una posibilidad de aproximación a este descubrimiento podría ser aislando anticuerpos monoclonales para complejos específicos de oligonucleótidos y poliaminas (93).

Recientemente se ha encontrado que los análogos de las poliaminas tienen una mayor afinidad por el DNA que sus compuestos precursores, pero también cuentan con una menor capacidad de agregarse para inhibir el crecimiento.

Sin embargo, estos análogos pueden competir con poliaminas naturales para unirse a sitios de DNA, permitiendo una inhibición del crecimiento (93). Pero esta afirmación necesita ser más detallada.

Reportes recientes demuestran que la sensibilidad de ácidos nucleicos a nucleasa micrococcal, DNasa II, y DNasa I es dependiente de la concentración de poliaminas, por lo cual parece ser que las poliaminas regulan la conformación de la cromatina (94).

PANCREAS

Las poliaminas pueden actuar como sustratos de las transglutaminasas, las cuales están presentes en células productoras de insulina (47, 48, 49) y desempeñan un papel importante en la liberación de la hormona.

Recientemente, se ha descubierto que las poliaminas se localizan en células productoras de insulina (β -pancreáticas) y que su biosíntesis "in vitro" es estimulada por glucosa (47, 50).

En adipocitos, la espermidina tiene un efecto parecido a la insulina, ya que inhibe la lipólisis y estimula la conversión de glucosa a dióxido de carbono, procesos que ciertamente se relacionan con cambios en la permeabilidad celular (51).

REPRODUCCION

Se han estudiado los efectos de las poliaminas en el sistema reproductor femenino y masculino en organismos humanos, conejos, ratas, cuyos, y otras especies. En condiciones normales y patológicas.

Hembras

El metabolismo de las poliaminas se ha estudiado durante el ciclo menstrual, en sangre, orina, placenta y líquido amniótico durante el embarazo, en mujeres con abortos espontáneos y en preclampsia.

Durante el ciclo menstrual la excreción urinaria de putrescina, espermidina y espermina corresponde a los períodos de menstruación y ovulación.

Existen estudios que indican que las poliaminas y las enzimas que las biosintetizan tienen una participación importante en el curso del embarazo y en su desarrollo normal, ya que muestran un incremento en plasma y orina en mujeres embarazadas, principalmente después de la formación de la placenta (putrescina).

También se han medido poliaminas en la placenta y se relacionan con la actividad de ciertas enzimas capaces de metabolizarlas.

Las concentraciones de poliaminas muestran cambios durante el curso del embarazo: la putrescina no es detectable al final de este, mientras que la espermidina declina permaneciendo a niveles bajos y constantes a partir de la

semana 25 de la gestación, la espermina se eleva de manera continua hasta el final del embarazo.

También, una baja en las concentraciones de poliamina oxidasa normalmente está asociada con el aborto espontáneo (61). Ya que los efectos depresivos de los productos de reacción entre esta enzima y las poliaminas sobre la proliferación de los linfocitos puede contribuir a la protección del feto y placenta contra un rechazo inmunológico materno, causa frecuente de abortos tanto espontáneos y recurrentes.

Otros estudios indican que la fuente de actividad de la poliamino oxidasa es la decidua más que la placenta. Por lo que los niveles bajos encontrados en pacientes con aborto espontáneo pueden indicar una alteración en la función decidual, pero estos cambios deciduales deben ser más ampliamente estudiados.

Machos

En machos, se ha medido el nivel de poliaminas en las diferentes glándulas accesorias, testículos, próstata, semen; se ha estudiado también la correlación que existe en los niveles de estos compuestos y la motilidad espermática. Se han asociado con la capacidad del espermatozoide para penetrar la capa de células granulosa que recubre al óvulo durante la ovulación femenina y con la fertilización.

Williams-Ashman, et.al. (56) reportaron que el semen humano contiene concentraciones elevadas de espermina (de 5 a 15 mM), además de espermidina, putrescina y cadaverina.

El hecho de que la concentración de espermina en el semen humano sea mucho más alta que en cualquier otro tejido o fluido corporal ha provocado especulaciones en cuanto a su función fisiológica.

Otros estudios "in vitro" indican que la espermina aumenta la actividad de la maltasa seminal, involucrada en la degradación de glucógeno, incrementando el consumo de glucosa en el espermatozoide y reduciendo el de fructosa.

La adición de espermina en cantidades fisiológicas a suspensiones de espermatozoides, provocan un aumento significativo en los niveles de AMP cíclico, nucleótido que induce la capacitación del espermatozoide.

METABOLISMO DE POLIAMINAS

Recientemente se ha reconocido que la mayor parte de la excreción de poliaminas es en forma conjugada, la mayoría de los investigadores utilizan el método de hidrólisis de Russell (HCl 6 N por 12-16 hr a 100°C - 120°C) (97) para obtener bases libres.

Estos potentes medios de separación son utilizados para la hidrólisis de péptidos, pero posteriormente se demostró que las poliaminas son excretadas en la orina principalmente como derivados monoacetilados. Se ha demostrado que las poliaminas putrescina (98), espermidina (99) y espermina (100) pueden ser acetiladas en tejidos de rata.

También se ha sugerido que en pacientes con cáncer hay un mayor incremento en la excreción de N¹-acetil espermidina que de N^β-acetil espermidina, y que la proporción de estos metabolitos puede tener importancia en el diagnóstico (101).

Sin embargo, existen autores (46) que dudan de esta premisa, ya que parece ser que la formación de N¹-acetil espermidina es el resultado de una acetilación citoplásmica, mientras que la N^β-acetil espermidina es formada en el núcleo, también se ha demostrado la desacetilación de ésta última (96).

Mientras que la acetilación de poliaminas es un medio en el se permite la excreción de la molécula intacta, la oxidación da origen primeramente a un aldehído mediante la acción de amino-oxidasas y posteriormente al ácido carboxílico mediante la acción mediadora de la aldehído deshidrogenasa, presente en los tejidos (Figura 24).

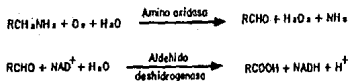


Figura 24 (96).

Las amino-oxidasas oxidan a la espermina y a la espermidina en el grupo amino terminal en la parte del aminopropilo. La poliamino oxidasa puede encontrarse en hígado de rata donde oxida a la espermidina y a la espermina en el grupo amino secundario dando lugar a putrescina y a espermidina, respectivamente y liberando β -aminopropionaldehído.

La oxidación es adyacente al grupo aminopropilo y tiene lugar aunque la amina terminal de este grupo sea acetilada. Además, la N^1 -acetilespermidina, la N^1 -acetilespermina y la $\text{N}^1, \text{N}^{12}$ -diacetilespermina son mejores como sustratos que como bases libres. Cuando éstas reaccionan, se elimina un aldehído, el β -acetamidopropionaldehído (96).

La diamino oxidasa obtenida de riñón porcino, oxida a las diaminas putrescina y cadaverina, aunque también puede utilizar histamina como sustrato (103).

Pero mientras se cuenta con una vasta evidencia de la presencia de las diamino y monoamino oxidasas, los descubrimientos acerca de otras amino oxidasas no se han considerado substanciales.

La importancia clínica de la diamino oxidasa en el metabolismo humano de poliaminas fue sugerida recientemente. Anteriormente se había demostrado que la administración de aminoguanidina, un potente inhibidor de la diamino-

oxidasa, a ratas preñadas causa un incremento de cinco veces la concentración normal de putrescina.

Con esto pareció, que si la mayoría de las poliaminas humanas fueran afectadas por la diamino oxidasa, las poliaminas determinadas en la orina serían entonces sólo una mínima fracción de la producción diaria. Por lo que se investigó el efecto de la administración de aminoguanidina (como hemisulfato o bicarbonato) en dos voluntarios humanos con dosis de 50 mg cuatro veces al día durante dos días. En cada caso la excreción de espermidina, que fue la más afectada, alcanzó de 0.5 mg a 3.0 mg por día aproximadamente (96).

Otros autores han investigado la oxidación de espermidina "in vivo" en ratón y han identificado al metabolito resultante (104, 105). En un extracto de hígado de ratones con ácido perclórico, tratado previamente con 1 mmol de trishidrocloruro de espermidina por kg de peso corporal, obtuvieron un metabolito que reaccionaba con cloruro de dansilo identificado por espectrometría de masas como monodansil-N-(3-aminopropil)pirrolidin-2-ona.

Sin embargo, cuando se administró N¹-acetilespermidina, no se encontró el metabolito, pero siguiendo con la hidrólisis ácida, se obtuvo isoputrescina (Figura 25).

En términos de espermidina, esto podría representar una producción diaria de 3,5 mg, que es consistente con la excreción de espermidina observada en los voluntarios tratados con aminoguanidina (96).

Por otra parte se confirmó la 'N-(3-aminopropil)-pirrolidin-2-ona o su conjugado no son marcadores útiles en ciertos estados patológicos.

Sin embargo, se ha demostrado una elevación de Isoputrescina en la orina hidrolizada de pacientes de linfoma y una excreción de poliaminas por debajo de los niveles normales, lo cual se ha considerado de particular interés (96).

Normalmente se esperan niveles urinarios altos de poliaminas en cáncer, el descubrimiento de una excesiva oxidación de espermidina, podría deberse a la presencia de diamino oxidasa en el tumor.

La actividad de la diamino oxidasa puede ser alta en muchos tumores como por ejemplo: en carcinoma medular de la glándula tiroidea, carcinoma de células pequeñas en pulmón, cáncer de ovario, otros tipos de cáncer ginecológicos y muchas otras variedades de cáncer.

Se ha demostrado que la actividad elevada de diamino oxidasa en los fluidos de pacientes con cáncer fue el mejor marcador de todos los estudiados.

La alta actividad de la diamino oxidasa en algunos tumores, puede dar resultados falso negativos en los análisis de determinación de las concentraciones de poliaminas para el diagnóstico de cáncer.

Aunque la acetilación y la oxidación parecen ser los principales mecanismos excretorios de poliaminas, se han encontrado complejos de poliaminas con uniones peptídicas covalentes. Estos complejos pudieron haberse formado por transglutaminación y podrían tener importancia fisiológica.

Russell (96) ha demostrado que la ODC puede ser modificada en subunidades lábiles de RNA polimerasa I por unión a putrescina mediada por transglutaminasas, se considera que este mecanismo puede ser una influencia directa para que las células proliferen.

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS DONDE INTERVIENEN POLIAMINAS

Se ha observado que la incubación de adipocitos de rata con Insulina, espermidina o espermina estimula la conversión de glucosa a ácido de carbono e inhibe la lipólisis cuando las concentraciones de poliaminas varían entre 1 - 50 μ M (50).

Cuando se utilizan concentraciones elevadas de espermidina y espermina, el aumento en la oxidación de glucosa y la supresión de la lipólisis son idénticas a los efectos producidos por la insulina.

El mecanismo por el cual la espermidina y la espermina tienen acciones parecidas a la Insulina no está muy estudiado, sin embargo, se sabe que éste no se debe a la fuerza iónica de estas moléculas, ya que al someter los adipocitos de rata al mismo estudio, la putrescina (de fuerza iónica similar) no presenta este comportamiento.

Por esta razón se cree que la inhibición de la lipólisis por medio de poliaminas se debe a supresiones en los niveles de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc), ya que la lipólisis inducida con epinefrina o teofilina es inhibida por poliaminas. Sin embargo, cuando se administra dibutilil AMPc esta acción no se produce (51).

Las poliaminas también intervienen en varios procesos biológicos a nivel de membrana. El grupo de Elgavish demostró que estas moléculas estimulan el transporte de D-glucosa en células renales ciliadas.

Dicho transporte quizá se deba a la inhibición de la vía Na^+/H^+ por espermina, estimulando así el mecanismo "simport" de D-glucosa y Na^+ . En presencia de Mg^{++} la espermina permite tener un 10 % de la actividad de la Mg-ATPasa.

Esto se debe a la habilidad de esta poliamina para reemplazar el Mg^{++} en la síntesis de ATP. El Mg^{++} reduce la carga negativa del ATP, formando Mg-ATP, que posteriormente se combina con la ATPasa. Las poliaminas tienen un efecto similar combinándose con el ATP (57).

Recientemente se ha demostrado que algunas enzimas de la vía glucolítica como hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvatoquinasa en el sitio de implantación en rata, son activadas significativamente por espermina (58, 59).

También se han realizado estudios de respirometría en los que se ha descubierto que la espermidina y espermina son capaces de activar la conversión de glucosa a dióxido de carbono, siendo esta esencialmente producida por insulina en células intactas y no en células lisadas.

En este punto, las poliaminas se comportan de manera similar a la cisteína, oxitocina y prostaglandinas, las cuales también tienen un efecto similar a la insulina (51).

METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS EN CELULAS VEGETALES

No está muy estudiado el papel de las poliaminas en las plantas superiores, aunque han sido relacionadas con el metabolismo de los ácidos nucleicos, en la síntesis de proteínas y en el crecimiento. También se han asociado con la inhibición del envejecimiento tisular (55).

Las poliaminas que más frecuentemente se encuentran en las plantas superiores son la putrescina, espermina y espermidina que se encuentran en las hojas, raíces y frutos. La putrescina se acumula en altos niveles en las plantas que crecen con deficiencia de potasio. La espermidina y la espermina se presentan conjugadas en algunos alcaloides vegetales (55).

Se ha demostrado que las poliaminas regulan, entre otros procesos, la permeabilidad de las membranas, debido a su habilidad para unirse con polianiones orgánicos como los fosfolípidos o con los ácidos nucleicos para realizar otras funciones (55).

Se ha descubierto también que las poliaminas promueven la síntesis de proteínas en plantas superiores "in vitro" e "in vivo" además de servir como un factor de crecimiento para ciertas células vegetales en cultivo.

Las poliaminas también pueden jugar un papel regulador importante en una gran variedad de células y tejidos vegetales sometidos a condiciones adversas, ya que la aplicación exógena de estas sustancias junto con lisina y arginina, retardan el envejecimiento progresivo de protoplastos en hojas de avena,

estabilizándolos, favoreciendo una alta incorporación de uridina leucina en las macromoléculas y aumentando la actividad mitótica.

Lo cual fue repetible en varias especies y se demostró que las poliaminas detienen la degradación de clorofila e inhiben la regulación de ribonucleasa y proteasas (55).

CAPITULO 6

APLICACIONES CLINICAS DE LAS POLIAMINAS

DETERMINACION DE POLIAMINAS Y SUS METABOLITOS EN TEJIDOS Y FLUIDOS HUMANOS

Los métodos analíticos utilizados en la determinación de poliaminas han sido revisados por varios autores y se han tomado en cuenta los problemas analíticos actuales y discutido el efecto de los anticuerpos antipoliaminas. Con el descubrimiento del HPLC (High-performance liquid chromatography), los métodos se han modernizado, permitiendo un alto grado de selectividad y sensibilidad, con resultados de cuantificación simples y la posibilidad de automatización.

Los métodos más recientes se han diseñado para separar, tanto acetilpoliaminas como bases libres, ya que si solamente se desean determinar poliaminas libres no se necesita una alta sensibilidad, para esto la separación isocrática de derivados de benzoilo sería el procedimiento más simple.

Así mismo, el análisis de aminoácidos derivados del metabolismo de espermidina y espermina se han descrito ampliamente.

Después de la demostración de Russell del incremento en la excreción de poliaminas en la orina de pacientes con cáncer, han aparecido varios reportes confirmando y extendiendo estas observaciones en orina y demostrando niveles elevados en suero.

El descubrimiento de altas concentraciones de putrescina en el fluido cerebroespinal parece ser un medio eficaz para la detección de tumores cerebrales, especialmente meduloblastoma.

Una tendencia reciente es la de medir poliaminas en las células formadas en sangre. Los autores han señalado, que las concentraciones medias de poliaminas en leucocitos son mucho más altas que en eritrocitos, pero como en la sangre se encuentra una proporción de 1:700 de estas células, la contribución más significativa (cerca del 80 %) proviene de los eritrocitos, contra solamente 20 % de los leucocitos (Tabla 9).

Tabla 9: Contenido de poliaminas en células sanguíneas (96).
Valores medios de contenido de poliaminas en células sanguíneas en términos de nanomoles por 10^9 células.

CELULAS	ESPERMIDINA	ESPERMINA
ERITROCITOS	1.06 ± 0.19	0.46 ± 0.09
PLAQUETAS	0.11 ± 0.02	0.04 ± 0.01
LEUCOCITOS MONONUCLEARES	266.5 ± 28.2	440.3 ± 61.4
LEUCOCITOS NUCLEARES POLIMORFO-	266.5 ± 28.2	440.3 ± 61.4

Las concentraciones relativamente altas de poliaminas en eritrocitos o en sangre entera y la rápida respuesta a cambios fisiológicos ha permitido a los investigadores medir las concentraciones de espermidina y espermina en los eritrocitos de pacientes con cáncer. Estas concentraciones de poliaminas disminuyen después de cirugía y/o quimioterapia en muchos casos.

El descubrimiento de altos niveles de poliaminas en cáncer es por supuesto, una indicación simple del crecimiento y/o de muerte celular. Los niveles elevados han sido encontrados en muchos tipos de enfermedades que Russell ha caracterizado como una participación de los factores de pérdida celular y/o

una proliferación incrementada, incluyendo a la fibrosis quística, psoriasis y distrofia muscular de Duchenne.

Se han encontrado también otras condiciones en las que se incrementan los niveles de poliaminas como por ejemplo, fallas renales agudas y enfermedades hepáticas crónicas.

También se han determinado altas expresiones de putrescina y cadaverina en algunas infecciones bacterianas así como en algunos tipos de cáncer (particularmente del tracto gastrointestinal) (96).

Los efectos antiproliferativos de los inhibidores de la síntesis de poliaminas en células tumorales desarrolladas en cultivos, normalmente no producen los mismos efectos "in vivo". Sin embargo, se han registrado muchos casos de efectos terapéuticos, asociados a la inhibición de la biosíntesis de poliaminas, frecuentemente combinados con otros agentes quimioterapéuticos (64).

Por ejemplo, el efecto clínico más dramático de la DMFO es el obtenido contra el protozoario Trypanosoma brucei gambiense, el causante de la enfermedad africana del sueño. De hecho, el tratamiento con DMFO curó a más del 95 % de los pacientes tratados en la última fase de la enfermedad, la cual involucra al sistema nervioso central y no responde a la terapia convencional. Otro protozoario sensible al tratamiento con DMFO es el Pneumocystis carinii, un agente infeccioso oportunista en pacientes con SIDA (64).

El efecto limitado de DMFO en el tratamiento de otras enfermedades infecciosas y varias formas de cáncer, puede deberse a multitud de

mecanismos de regulación que sirven para mantener el contenido óptimo de poliaminas en la célula. Un mayor entendimiento de estos mecanismos podría contribuir al diseño racional de nuevos y potentes fármacos para el tratamiento de enfermedades parasitarias y desórdenes proliferativos que afectan al hombre (64).

La inhibición de la proliferación celular por medio de inhibidores específicos de la síntesis de poliaminas, puede ser revertida al añadir cualquiera de las poliaminas principales (putrescina, espermidina y espermina), aún en bajas concentraciones, lo cual se ha demostrado en algunos sistemas como por ejemplo (66):

- Explantes cultivados de glándula mamaria
- Linfocitos estimulados con concavalina A
- Cultivo de embriofibroblastos de rata
- Cultivos de células malignas hepáticas de rata
- Desarrollo de huevos fértiles de erizo de mar

También existen evidencias experimentales que sugieren que las poliaminas están íntimamente relacionadas con la regulación de hipertrofia e hiperplasia celulares (65, 66).

REPRODUCCION

EMBRIOGENESIS

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina juegan un importante papel en el crecimiento y en la proliferación celular. En órganos del sistema reproductor femenino de la hembra, su acumulación depende del estímulo hormonal, como hemos mencionado dentro de los efectos biológicos de las poliaminas.

Las actividades de ODC y de la SAMDC surgen repentinamente al principio de la gestación, paralelas a un incremento en la síntesis de RNA y proteínas. Estos parámetros podrían ser indicativos del inicio de la decidualización inducida por el blastocito.

La embriogénesis es uno de los sistemas más activos de división y diferenciación celular en mamíferos, y existen numerosos estudios en el incremento de la actividad de ODC durante este proceso (67). Durante la embriogénesis en mamíferos, después de la implantación se presenta una elevación brusca en la actividad de la ODC uterina (68), así como también se produce un incremento en las concentraciones de putrescina (esencial en el período crítico después de la implantación) y espermidina, con pequeños cambios en la concentración de espermina (67).

Cuando se administra DMFO continuamente durante la gestación temprana, se detiene el desarrollo embrionario en el ratón, rata y conejo (68, 60).

La implantación no parece afectarse, pero se da una detención temprana del desarrollo embrionario lo que conduce a una reabsorción, ya que no se encontraron fetos desarrollados en ninguna de las especies estudiadas 24 horas antes del parto (60, 61)

El efecto inhibitor de la DMFO es revertida por la administración de putrescina (producto normal de la reacción inhibida) o también por la administración de progesterona, que induce la síntesis de ODC (61).

Los principios para la administración de la DMFO podrían ampliarse a otras especies de mamíferos con períodos de gestación más prolongados y servir como un medio para usos clínicos con enfoques contraceptivos. Así como también ofrece perspectivas en la investigación en el campo de la reproducción, como por ejemplo los mecanismos moleculares de la diferenciación embrionaria, cuyas fallas normalmente se reflejan en alteraciones durante el desarrollo, muerte fetal y abortos (60).

CANCER

PROSTATITIS

Desde hace más de 20 años se señaló una posible relación entre el incremento de poliaminas en orina en diversas entidades clínicas, particularmente en pacientes con cáncer. También se ha demostrado la disminución de dichos niveles después de tratamientos exitosos con inhibidores específicos de la biosíntesis de poliaminas (1).

En varias enfermedades, además de la prostatitis se incrementa la concentración de poliaminas en la orina. Lo cual ha conducido a investigar los niveles de poliaminas en el cáncer de próstata o prostatitis y en condiciones normales. Se sabe que normalmente, los niveles de poliaminas son elevados en esta glándula. No obstante, la mayor excreción de poliaminas en la orina se encuentra en pacientes con cáncer grado II o mayor (1).

Dunzendorfer y Russell (63) estudiaron la inhibición de ODC en casos de prostatitis no supurativa crónica, basados en el conocimiento de que la DMFO afecta el aumento de peso de la próstata ventral de la rata y de las vesículas seminales durante el crecimiento de los animales.

Estos resultados mostraron una respuesta clínica parcial con desaparición de la hematosperrmina, después de la administración oral de 18 g de DMFO/día (LD₅₀5g/kg peso) durante un mes. Algunos parámetros bioquímicos, tales como _glutamyl-transferasa, hormona luteinizante, testosterona en semen, así como la vitalidad y la movilidad espermática mostraron cambios importantes en

pacientes tratados con DMFO, induciendo un efecto significativo sobre la actividad de la próstata.

Durante el período de tratamiento se observó una reducción en el tamaño de la próstata. Solamente en 2 de 20 pacientes se observó una reducción en hematocrito y en hemoglobina, que revirtieron a los dos meses de suspensión de la terapia (63).

Estas observaciones también sugieren que la determinación de los niveles de pollaminas en orina, pueden ser una prueba útil para la detección de la malignización de la próstata, en una etapa potencialmente curable (63).

Se han demostrado también elevadas concentraciones de pollaminas en suero, orina y líquido cefalorraquídeo en pacientes con diversas neoplasias, incluyendo leucemias, psoriasis y fibrosis quística, entre otras (63).

PROMOCION TUMORAL

La formación de un tumor en piel de ratón está dividida en dos fases: iniciación y promoción. La iniciación esta acompañada por el tratamiento cutáneo con un carcinógeno en dosis muy bajas que en raras ocasiones desarrolla tumores.

La piel tratada contiene algunas células alteradas de modo irreversible, en donde la aplicación de un segundo agente (agente promotor) produce numerosos tumores, tanto benignos como malignos. Este agente no puede considerarse un carcinógeno, ya que su aplicación primaria no es efectiva. Este agente es ejemplificado por el 12-O-tetradecanollforbol-13-acetato (TPA).

La inducción de ODC (300 veces su concentración normal en 5 horas) por TPA y su consecuente incremento en las concentraciones de putrescina y espermidina, fue reportada por O'Brien, et. al.(69).

Para determinar la relevancia de esta inducción y del mecanismo de la formación tumoral se han realizado estudios que incluyen la determinación del efecto sobre la inducción de la enzima, el nivel de poliaminas (como productos) en el tejido y la incidencia tumoral.

Las variables utilizadas fueron: la estructura del agente carcinogénico, la dosis del agente y el efecto de las sustancias modificadoras de la inducción de la enzima y de la incidencia tumoral, inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, retinoides, poliaminas y DMFO.

La inhibición de ODC es dependiente de la dosis de DMFO antes del tratamiento con TPA.

En todos los casos la elevación de ODC y de poliaminas juegan un papel esencial en la incidencia y promoción tumoral. La especificidad de la DMFO para inhibir a la ODC y su habilidad para detener la promoción tumoral, bajo protocolos idénticos de investigación, proporciona evidencias de las importantes perspectivas de este descubrimiento (69).

INHIBICION DEL CRECIMIENTO TUMORAL

Marion (72) demostró que la DMFO inhibe el crecimiento de tumores L 1210 en cultivos, posteriormente y siguiendo esta observación, Prakash, et.al., demostró los efectos de este inhibidor en ratones inoculados IP con el mismo tipo de células leucémicas (L 1210), los resultados obtenidos mostraron que una dosis de 200 mg/kg cada 6 horas incrementó la sobrevivencia de 7,6 a 9,3 días.

Este tratamiento redujo la actividad de la DMFO en el bazo de los ratones infectados en un 75 % y disminuyó las concentraciones de putrescina y espermidina.

Subsecuentemente, se demostraron marcados efectos antitumorales durante la administración de DMFO al 3 % en el agua de consumo, en ratón con sarcoma mamario murino EMT6. La respuesta fue similar a la obtenida con ciclofosfamida (4 inyecciones semanales de 100 mg/kg) y fue asociada con la inhibición de ODC tumoral y con la reducción en los niveles de putrescina y espermidina (67).

Pero, al administrar un inhibidor de la diamino-oxidasa y de la SAMDC: la 1.1'-(metiletanodilideno-dinitrilo)-7-bis-(3-aminoguanidina), se dió una reversión completa de los efectos antiproliferativos de la DMFO y de las deficiencias intracelulares de putrescina y espermidina. Lo cual implica una reducción en los niveles de poliaminas como parte del efecto inhibitorio del tumor.

En otros estudios, se obtuvieron efectos antitumorales substanciales contra tumores mamarios en ratas tras la administración de 7,12-dimetilbenzo-antraceno (DMBA), en donde los tumores comenzaron a desaparecer después de 50 a 60 días de la administración y recurrieron después de 105 días (67, 73).

El tratamiento iniciado 30 días después del DMBA con DMFO al 2 % en el agua de consumo, marcó lentamente la desaparición de tumores y durante la autopsia se observó que los tumores se redujeron casi la mitad del tamaño promedio.

En estudios más recientes, se ha examinado la acción antitumoral de la ODC en combinación con los agentes antitumorales establecidos. Se han realizado estudios con DMFO en combinación con adriamicina o vindescina en células leucémicas L1210, en carcinoma mamario murino EMT6 y en hepatoma de Morris 7288C en ratas; también se ha asociado la DMFO con ciclofosfamida para el tratamiento del carcinoma EMT6 y en cáncer mamario inducido por DMBA y en todos los casos se observó un efecto de potenciación (72, 67).

También el DMFO ha sido asociado al cisplatino, adriamicina, 1,3-bis-(2-cloroetil)-1-nitrosourea e Interferón en roedores y humanos, donde ha potenciado el efecto de estos fármacos. Y los efectos de inhibición de la DMFO han sido compatibles con los efectos de estos fármacos en varias líneas cancerosas, incluyendo tumores sólidos (73).

Como los efectos antitumorales de DMFO han sido claramente obtenidos sin mostrar signos de toxicidad, podemos concluir que debido a la inhibición de la biosíntesis de poliaminas, el tratamiento con DMFO disminuye el crecimiento

tumoral en forma efectiva y sin la toxicidad de otros fármacos antitumorales (67).

ODC COMO INDICADOR DEL GRADO DE MALIGNIDAD EN NEOPLASIAS HUMANAS

Se han realizado múltiples estudios para determinar la relación entre el nivel de pollaminas y el cáncer, particularmente para la utilización de la concentración de ODC como indicador de la ruta de crecimiento y de la malignidad de ciertos tipos de neoplasias humanas.

En 1971, Russell y Bremer, demostraron una excreción elevada de pollaminas en pacientes con cáncer o con cistinuria. Pero se enfatizó el hecho de que este incremento no necesariamente es característico de un estado neoplásico, ya que estos incrementos también se han determinado en pacientes con psoriasis, fibrosis quística, lupus eritematoso sistémico y en algunas desviaciones en el metabolismo

de aminoácidos, infecciones, anemia perniciosa y hemolítica, en ciertos estados fisiológicos normales y patológicos y en otras enfermedades.

En determinaciones de los niveles de actividad de PBD en diferentes tipos de tejidos neoplásicos primarios en oncología experimental se ha observado frecuentemente un incremento en la actividad de PBD y principalmente en la de ODC.

En investigaciones con hepatomas de rata con diferente velocidad de crecimiento y durante la carcinogénesis química en piel de ratón, se ha demostrado el grado de aumento en las concentraciones de ODC, lo cual podría considerarse un indicador bioquímico de la actividad del crecimiento neoplásico.

En estudios más recientes se han presentado datos de las diferencias en los niveles de actividad de PBD en distintos tipos de tumores, el grado de incremento en la actividad de ODC se correlaciona de forma adecuada con la ruta de crecimiento neoplásico, debido a que en los epitelomas es más alto que en carcinomas celulares escamosos y que en los epitelomas celulares basales (Tabla 10).

También se ha observado una dramática disminución en la actividad de ODC en leucocitos de pacientes con leucemia mieloide crónica, después de una terapia exitosa (Tabla 10).

La proporción del incremento en la actividad de ODC en SNC, relacionada con tumores, es directamente proporcional a la malignidad de los mismos, lo cual también es válido para los meningiomas en que las formas típicas tienen más baja actividad de ODC que las formas atípicas.

Tabla 10:

Niveles de la actividad de ODC en diferentes tipos de tumores humanos. Los resultados se encuentran expresados en valores promedio más menos el error estándar. La significancia estadística está evaluada mediante la prueba de t de Student. SNC = Sistema Nervioso Central; CML = Leucemia Mieloide Crónica; DNM = Detectable pero No Medible.

TUMORES	ACTIVIDAD DE ODC (pmol de CO ₂ /mg de proteína/30 min.)	No. de pacientes
EPITELIOMAS CUTANEOS Epiteliomas celular basal Carcinoma celular escamoso	3.5 ± 0.8 22.7 ± 3.7 P < 0.001	(7) (7)
TUMORES DEL SNC Espongioblastoma polar	1.2 ± 0.29	(4)
Astrocitomas diferenciados (grado 1 y 2) Astrocitomas dediferenciados (grados 3 y 4; GMB)	4.5 ± 1.28 30.3 ± 4.93 P < 0.001	(8) (8)
Meduloblastoma	42.0 ± 9.49	(3)
Meningioma típico Meningioma atípico	6.1 ± 0.32 14.7 ± 2.78 P < 0.05	(4) (4)
LEUCOCITOS LEUCEMICOS (CML) Sin tratamiento Posterior a la terapia	2.90 ± 0.13 DNM	(4) (4)

Por último cuando comparamos la confiabilidad de las determinaciones del contenido de poliaminas con las determinaciones de los niveles de ODC como medias de diagnóstico y pronóstico en diferentes áreas de oncología clínica, podemos realizar las siguientes observaciones (74):

- a) La medición de los niveles de poliaminas en fluidos fisiológicos pueden utilizarse para una evaluación a corto plazo del curso específico de la terapia y para la detección de la remisión o reincidencia de la enfermedad, pero es de poca o nula utilidad en la evaluación del grado de malignidad del tumor, aún cuando esté combinado con un ensayo de poliaminas en el tejido neoplásico.

- b) Los niveles de la actividad de ODC son los mejores indicadores del grado de malignidad del tumor, pero no es de utilidad en la evaluación de la eficacia de la terapia, con la excepción de terapias hematológicas, en las cuales los ensayos de los niveles de la enzima en las células tumorales son reproducibles.

Por lo cual podría utilizarse la determinación del nivel de ODC durante el diagnóstico y la determinación del nivel de poliaminas en el curso de la terapia.

QUIMIOTERAPIA

Como ya mencionamos, la iniciación del crecimiento celular en mamíferos es acompañada por un incremento en la actividad de los enzimas que biosintetizan poliaminas y en la concentración de éstas.

Si la biosíntesis de poliaminas es detenida, también se detiene el crecimiento celular y bajo ciertas circunstancias se produce la muerte celular. Debido a que las células neoplásicas tienen un crecimiento más acelerado que las células normales, las vías de biosíntesis de poliaminas pueden ser blancos efectivos para reducir el crecimiento de células neoplásicas y por lo tanto como un medio de terapia del cáncer (75).

Sjoerdesma, et.al., revisaron los posibles usos de la DMFO y los inhibidores de la ODC como agentes quimioterapéuticos (76). La acción proliferativa de la DMFO sugiere que podría ser efectiva para lograr una reducción en la velocidad de crecimiento tumoral, lo cual se ha demostrado en varios modelos

experimentales. Sin embargo, la falta de efectos citotóxicos implica que es poco probable su eficacia clínica.

Esto también incluye su eficacia en cánceres como carcinomas de células pequeñas de pulmón (4), células tumorales de rata 9L, mieloma murino (75), en donde DMFO es citotóxica.

Sin embargo, es posible que otros inhibidores de la ODC más potentes, pudieran ser más activos en el tratamiento de neoplasias humanas, como (2R, 5R) MAP, que es más eficaz como agente antitumoral en modelos animales.

También se ha sugerido que la combinación de DMFO y MGBG podría potenciar la actividad de MGBG, ya que con el primero se incrementa el consumo celular del segundo agente, pero el MGBG posee una gran toxicidad.

Otras investigaciones sugieren que la combinación de agentes antineoplásicos con inhibidores de la biosíntesis de poliaminas podrían tener efectos quimioterapéuticos benéficos, ya que los primeros se unen al DNA.

Sin embargo, debe tenerse extremo cuidado en la elección de los agentes, aun cuando el pre-tratamiento con DMFO reduzca la sensibilidad a ciertos fármacos como el cisplatino por medio de la correlación con una disminución en el número de entrecruzamientos con platino. Estos resultados enfatizan que la reducción de poliaminas podría originar cambios significativos en la cromatina y en la estructura del DNA y otros efectos de estos cambios más complejos (4).

A pesar de todo lo mencionado, es posible utilizar los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas por medio de la ODC para prevenir o retardar la ruta de crecimiento tumoral junto con radiaciones u otros agentes quimioterapéuticos.

PSORIASIS

La psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica, pocas veces aguda, recurrente, no contagiosa, de causa desconocida que evoluciona en brotes separados por períodos de remisión total. Esta constituida por placas eritemoescamosas en diversas partes de la piel (77, 78).

La topografía de las regiones es variada y los sitios de predilección son las salientes óseas, la cara extensora de las extremidades, rodillas, cuero cabelludo y la región sacro-coxígea (77, 78).

Las lesiones elementales son eritema y escamas, siempre se encuentran combinadas y pueden observarse placas de diversos tamaños y forma, aunque por lo general, las placas están bien delimitadas y son blancas, gruesas de aspecto yesoso. Aunque hay ocasiones en que las escamas no son tan abundantes y se descubre el eritema subyacente (78). El diagnóstico normalmente es sencillo pero hay ocasiones en que tiene que recurrirse a la histopatología (79).

La duración del ciclo celular psoriático no está bien determinada pero se sabe que se presentan células proliferativas en las lesiones, donde las pollaminas están involucradas.

Desde hace casi 20 años se reportaron niveles altos de espermidina y espermina en sangre de pacientes con psoriasis, aunque el nivel de estas pollaminas en las lesiones era más baja que en los sujetos de control.

Esta discrepancia motivó la medición de la concentración de poliaminas y de las actividades de las enzimas involucradas en su biosíntesis en pacientes con psoriasis con grupos de control.

También se determinó el nivel de poliaminas en orina y se encontraron los siguientes resultados:

- a) Los niveles de poliaminas en piel fueron más altos en pacientes con epidermis afectada que en la de pacientes con psoriasis con epidermis sana.
- b) Los niveles de poliaminas fueron más altos en epidermis afectada de pacientes con psoriasis que en piel sana.
- c) Los niveles de poliaminas fueron más altos en orina de pacientes con psoriasis que en el grupo de control.
- d) La actividad de ODC es 6 veces más alta en epidermis afectada que en la no afectada de pacientes con psoriasis o sanos.
- e) A las 24 horas de una aplicación de diacetato de difluorasona (Glucocorticoide) en las lesiones la actividad de la ODC se redujo marcadamente.

Se sabe que la α -MO es un inhibidor de ODC en fuentes no cutáneas que inhibe la actividad de esta enzima en lesiones de psoriasis. otros agentes

también podrían reducir los niveles de poliaminas en lesiones psoriáticas si se pudiera lograr una absorción percutánea (66).

La potencialidad terapéutica de la farmacología de las poliaminas en la psoriasis es evidente. Experimentos realizados en sistemas celulares básicos han mostrado que cuando se reducen los niveles de poliaminas en forma marcada, la proliferación celular es lenta.

Sin embargo, hacen falta estudios para determinar la potencialidad terapéutica de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas en el tratamiento de la psoriasis, aunque se ha utilizado clínicamente DMFO en el tratamiento de esta enfermedad (76).

Por otra parte, se ha demostrado recientemente que los retinoides orales han sido eficaces en el tratamiento de la psoriasis, aunque actúan por medio de un mecanismo desconocido. Sin embargo, se sabe que los retinoides inhiben marcadamente la síntesis de poliaminas por un mecanismo parecido al de una hormona esteroide, la cual bloquea la expresión del gene de la ODC (66).

INFECCIONES PARASITARIAS

TRIPANOSOMIASIS

El Tripanosoma brucei brucei es un protozooario del orden cinetoplástida, el cual se caracteriza por la presencia de un cinetoplasto, una región mitocondrial que contiene DNA y que se localiza cerca de la base del flagelo.

El T.b.brucei causa tripanosomiasis bovina (Nagana) en el ganado y otros tripanosomas (T.b.rhodesiense, T.b.gambiense) causan la enfermedad del sueño en el hombre. Estos parásitos se transmiten por un vector que en este caso es la mosca tse-tse (4, 79, 80). En mamíferos el habitat de estos parásitos es la sangre y linfa así como en otros tejidos donde se dividen por fisión binaria (62).

Bacchi, et.al., iniciaron estudios experimentales con DMFO en tripanosomiasis (79, 70) que culminaron en el descubrimiento de un efecto curativo en ratones infectados. Estos investigadores descubrieron importantes evidencias de las funciones importantes de las poliaminas en tripanosomas y en el mecanismo de acción de varios fármacos tripanocidas (70).

Los ratones infectados y tratados con DMFO fueron curados por completo, mientras que los no tratados perecieron al 5o. día de la infección.

Los parásitos desaparecieron de la sangre a los 5 días del inicio del tratamiento y los frotis de sangre tomados a los 30 días de la muerte de los controles fueron negativos (79, 67, 70). Los resultados obtenidos dieron las siguientes evidencias:

- a) Una respuesta dosis dependiente de DMFO en este modelo recibiendo dosis continuas, indicó que los parásitos desaparecen al 5o. día del tratamiento, y se observó la ausencia de los parásitos hasta el día 30.

- b) Evidencia farmacológica de que la acción curativa de DMFO es debida a la inhibición específica de EDC de tripanosomas y a una reducción de poliaminas en los parásitos como el factor crítico en la respuesta biológica (67). Lo cual se confirmó con la administración a animales infectados de espermina, espermidina o putrescina junto con DMFO a los animales, los cuales retuvieron la infección sobreviviendo durante 10 a 14 días más que los controles y murieron eventualmente.

- c) Los tripanosomas actúan por la vía de un mecanismo de síntesis de poliaminas y sus acciones son intensificadas por DMFO.

Debido a que el tratamiento con DMFO causa una reducción gradual en la parasitemia antes de la ausencia total del parásito en sangre a los 5 días de tratamiento, esto parece ser consistente con un mecanismo total de acción que involucra la detención de la replicación celular antes de la citotoxicidad parasitaria (79).

La ODC de los tripanosomas no es más sensible a la DMFO que la ODC humana. DMFO penetra en los parásitos por difusión pasiva, así que no se da un consumo selectivo de la enzima. La ruta de síntesis de ácidos nucleicos sufre un gran descenso en los tripanosomas tratados y la reducción de poliaminas induce cambios morfológicos de formas alargadas a formas cortas con múltiples núcleos y cinetoplastos.

Estos cambios concuerdan con la idea de que los tripanosomas requieren de poliaminas para la replicación celular normal, y en su ausencia, el sistema inmune puede actuar contra los parásitos ya que tienen una lenta replicación celular.

La naturaleza no tóxica de la DMFO y el éxito de su administración oral sin precedentes en la quimioterapia de la tripanosomiasis, aumenta las perspectivas para la utilización de este compuesto en algunas formas de tripanosomiasis en animales y en humanos (67).

Se ha sugerido otro posible sitio de acción, ya que los tripanosomas contienen una glutatona reductasa que requiere de un cofactor con espermidina para llevar a cabo su actividad. Este cofactor es llamado tripanotionina y se ha purificado del insecto vector del tripanosoma Citrithidia fasciculata y se ha identificado como N^1, N^8 -bis(L-_-glutamyl-L-hemicistinilglicil) espermidina.

La síntesis de este cofactor podría bloquearse en las células en las que se produce una reducción de espermidina. Sin embargo estudios posteriores demostraron la poca factibilidad de este mecanismo en Fimeria tenella, ya que la tripanotiona no se encuentra en esta especie y su crecimiento es fuertemente inhibido por DMFO (4).

Otra demostración de los efectos de la ODC sobre las infecciones por tripanosomas en ratones se efectuó utilizando el Tripanosoma brucei rhodesiense de animales y del hombre, utilizando una cepa 100 % letal para ratones no inmunes dentro de los primeros 6 días de la infección, cuando el número de tripanosomas alcanza 1,000/ml en sangre.

Cuatro grupos de 5 ratones recibieron 1.000 tripanosomas cada uno, y una concentración del 2 %, 1 % y 0.5 % de DMFO en el agua de consumo a partir del día de la infección, el cuarto grupo se tomó como control.

Los ratones control comenzaron a morir a partir del cuarto día, y se buscó la presencia de parásitos en la sangre residual. Los demás animales debían morir a los pocos días de que la infección alcanza 10^6 tripanosomas/ml, pero se comprobó que DMFO al 2 % brinda una acción protectora (79).

Los resultados son similares a los obtenidos con el *T.b.brucei*, con excepción de que las curaciones fueron obtenidas con una concentración del 1 % administrada un día después de la infección y continuada durante 3 días más.

Las diferencias entre los resultados de ambos experimentos pueden deberse a uno de los siguientes factores (79):

- a) Los parásitos pueden diferir en su sensibilidad a DMFO.
- b) La cepa de *T.b.rhodesense* podría invadir rápidamente los espacios de tejido, en donde los niveles de DMFO no alcanzan concentraciones terapéuticamente eficaces.
- c) El sistema inmune del huésped puede responder menos a una infección por *T.b.rhodesense*, ya que las cepas genéticas de ratón difieren en susceptibilidad. No obstante, esto significa claramente que en los animales infectados por cualquiera de las dos especies de

trípanosomas, DMFO tiene un efecto protector permanente en infecciones rápidas fulminantes.

COCCIDIOSIS

Coccidia es un grupo de protozoarios parásitos heterogéneos que causan enfermedades llamadas coccidiosis en el epitelio intestinal de los vertebrados (79, 67).

Un parásito típico en las aves, el Eimeria tenella, crece intracelularmente en las células epiteliales del Caeco cecum como un trofozoito, que posteriormente sufre una esquizogonia (forma de mitosis múltiple), para formar un gran número de merozoitos, los cuales son liberados para interactuar con otras células, como por ejemplo la pared de saco de pollo que es muy dañada. El daño se manifiesta por una hemorragia severa y una muerte posterior (79).

DMFO tiene un efecto anticoccidial potente contra estas infecciones (79, 80), reduciendo las infecciones cecales. En estas infecciones los efectos terapéuticos reversibles de DMFO pueden observarse aún con la administración concomitante de poliaminas que evitan el bloqueo enzimático (80).

MALARIA

Los parásitos del género Plasmodium son los causantes de la malaria. El Plasmodium falciparum, es una de las principales especies que causa esta aguda enfermedad en el hombre y está ampliamente distribuida en

sudamérica, africa y el sureste de asia, se transmite por un vector que es la hembra del mosquito Anopheles.

En el huésped, la malaria se multiplica rápidamente en los eritrocitos donde metaboliza la hemoglobina y otros constituyentes de los eritrocitos. El parásito intracelular es un pequeño trofozoito que crece y se reproduce asexualmente por esquizogonia; el ciclo de vida es similar al que sigue la eimeria inicialmente.

En 1981, Cain, et.al., reportó los resultados de los estudios iniciales sobre los efectos de DMFO en cepas de P.falciparum (70). Cain realizó cultivos in vivo y midió el desarrollo de los parásitos desde el principio de un ciclo esquizogónico, determinó que DMFO tiene un efecto significativo en la esquizogonia.

24 horas después de la administración de DMFO, los trofozoitos aparecieron más pequeños que en las cepas de control, sometidas a bajas concentraciones de DMFO. Esta diferencia se acentuó a las 36 horas, acompañada por una reducción en el número de esquizoitos en las células tratadas con concentraciones más altas de DMFO (79).

Los parásitos tratados fueron aparentemente detenidos en la etapa de trofozoito, mostrando cambios en la esquizogonia. Esta tendencia fue continua durante 48 horas, tiempo en el cual los cultivos de control mostraron también un incremento en los números relativos de las etapas anulares tempranas. Esto indica que una cantidad apreciable del parásito invade nuevos eritrocitos en estas cepas (79).

Concentraciones relativamente altas de DMFO (5.0 a 6.6 mM) parece bloquear la habilidad de los parásitos para dividirse mitóticamente en forma similar a los efectos de DMFO en células de mamíferos, donde el decremento en los niveles de poliaminas intracelulares causan un cambio en la síntesis de DNA (79, 70). Para probar esto se examinaron los efectos de DMFO en la incorporación de ^3H -hipoxantina, un precursor de ácidos nucleicos en la especie en cuestión.

Una concentración de 10 mM de DMFO inhibió fuertemente la incorporación de hipoxantina en el material precipitable con ácido tricloro-acético, pero no antes de 9 horas, tiempo requerido para disminuir los niveles de putrescina y espermidina (79).

EFFECTOS ANTIMIRALES

DMFO inhibe, como ya hemos visto, la actividad de la ODC, previniendo la proliferación celular en cepas después de que se han reducido las poliaminas endógenas y el ciclo celular es detenido antes de la iniciación de la síntesis de DNA y del final de la fase G1.

El efecto inhibitorio puede revertirse por la provisión exógena de putrescina, espermidina o espermina mostrando por tanto que hay un requerimiento absoluto de poliaminas en la proliferación celular. Los parásitos intracelulares son obligados, y durante su replicación el genoma infeccioso modifica el metabolismo de la célula huésped para producir un ácido nucleico viral específico y proteínas.

Puesto que las poliaminas son requeridas para la síntesis macromolecular durante la multiplicación de células procariontes y eucariontes, es razonable proponer que estas bases alifáticas deberían también ser requeridas para la replicación de los virus.

Las poliaminas han mostrado ser esenciales en la replicación de diferentes virus bacterianos pero se conoce poco de los requerimientos similares en la replicación de virus de animales.

La extrapolación de sistemas procariontes a eucariontes es poco aconsejable, en vista de la asociación aparentemente única de espermina con las células animales.

La replicación de ciertos virus animales en cultivos de células, se previene por inhibidores de la biosíntesis de poliaminas de células de animales infectadas por virus.

Esto es una desafortunada omisión, puesto que tales modelos podrían responder preguntas fundamentales de la naturaleza general concerniente a las funciones biológicas de las poliaminas.

Más específicamente el metabolismo alterado de las poliaminas, el cual es consiguiente a la infección viral, podría ser pertinente en relación a la patogenicidad de las enfermedades virales. El efecto antiviral de los inhibidores de las poliaminas demostrados "in vivo" también fomenta la posibilidad de su uso en un contexto quimioterapéutico.

Aunque se ha demostrado un efecto antiviral de DMFO contra el virus vaccinia y el citomegalovirus humano (CMV) en células diploides humanas (MRC-5) con valores de ED50 de cerca de 5 mM en cada caso, la replicación del virus de herpes simple tipo 2 (HVS-2) no fue afectada por DMFO.

Así mismo, concentraciones iguales de la enzima no inhiben la replicación del HVS-2 o CMV murino en cultivos de células primarias de fibroblastos de embrión de ratón (MEF).

El crecimiento de HVS-2 en células ZBHK-21, muestra que son afectadas por DMFO, pero solamente después de la exposición de los cultivos de células al inhibidor después de la infección. Al pretratamiento con DMFO, es una parte integral de la prueba de reproducción de placa, en la cual no ha sido efectivo.

Sin embargo, la propiedad antiviral del metilglicoxal (MGBG) contra HVS-2, podría no solamente demostrarse en el régimen similar utilizado. Estas aparentes discrepancias, podrían resolverse por la observación, que a diferencia de los resultados obtenidos en las células humanas, DMFO 10 mM no inhibe la replicación del virus vaccinia en cultivos de MEPO, aunque se manifiesta algún efecto por altas concentraciones del compuesto.

Esto es concebible, ya que DMFO no alcanza una concentración intracelular en ciertos sistemas celulares huésped para ejercer un efecto inhibitorio contra la replicación del HVS-2.

Los efectos antivirales de DMFO podrían relacionarse al incremento o expresión continua de la actividad de la ODC en células infectadas con vaccinia o CMV. En contraste, el HVS-2 no estimula la actividad de la enzima y entre otras infecciones de HVS, la síntesis de poliaminas se inhibe.

El fracaso de DMFO para inhibir la replicación de HVS-2 en los sistemas celulares utilizados sugiere que no se requiere la biosíntesis de poliaminas para la replicación de este virus.

Un estudio reciente demuestra que el MGBG tiene un efecto antiviral más potente "in vivo" que otros fármacos utilizados clínicamente en el tratamiento de CMV en humano (71).

SISTEMA INMUNOLOGICO

ACTIVACION DE LINFOCITOS B

Se ha demostrado (108) que la N, N'-Diacetilputrescina-(tetrametilen-bis-acetamida) (TMBA) y su análogo hexacarbonado, hexametilen-bis-acetamida (HMBA), inhiben la respuesta proliferativa de linfocitos B humanos a anti- μ y estimulan la cepa Cowan I formolinizada de Staphylococcus aureus (SAC).

En contraste, el factor de crecimiento de las células B estimulado para proliferación de células B humanas fue mínimamente inhibido por TMBA o HMBA.

El efecto antiproliferativo de estos derivados de diaminas fue específico para la activación anti- μ (o SAC) de células B normales, debido a la proliferación de células T humanas estimulada por PHA y las células B humanas transformadas no fueron afectadas por la presencia de TMBA o HMBA.

El efecto inhibitorio de las diaminas diacetiladas en anti- μ (o SAC) indujeron activación de las células B que resultó ser dosis dependiente y persistió aún después de remover los derivados de diaminas del medio de cultivo.

Estos estudios muestran que los derivados diacetilados de poliaminas modulan la activación de células humanas B "in vitro" por abrogación específica de la activación de anti- μ o SAC (108).

Se sabe que los derivados monoacetilados de las poliaminas son endógenos. La monoacetilputrescina se encuentra en la membrana de células plasmáticas

(109), y se ha demostrado que esto es un efector positivo en el control por retroalimentación de la ODC (110, 111).

Por lo tanto, se sabe que ciertos derivados acetilados de las poliaminas son moduladores de ciertas funciones celulares.

Debido a que los derivados acetilados de poliaminas no han demostrado ser endógenos, la significancia biológica del papel que desempeñan en la modulación de la activación de las células B "in vivo" falta ser determinada.

Sin embargo, el descubrimiento de inhibidores específicos de la activación de las células B será muy importante en el entendimiento de los complejos procesos de la activación, proliferación y diferenciación de las células B (108).

FARMACOLOGIA DE LAS POLIAMINAS

Existe poca información acerca de la actividad farmacológica de las poliaminas.

La putrescina ha sido administrada a ratas por vía intraperitoneal en dosis de 200-400 mg/kg de peso e inyectada en cerebro por vía ventricular (100 nmol/rata) con lo que se ha demostrado que ésta tiene un efecto analgésico dosis dependiente. En estas circunstancias no se ha observado ninguna toxicidad colateral (54).

CAPITULO 7

CONCLUSIONES

Y

PERSPECTIVAS EN LA UTILIZACION DE POLIAMINAS

Se sabe claramente, que todas las células estimuladas para reproducirse, muestran pequeños incrementos en las enzimas biosintéticas y posteriormente en los niveles de poliaminas.

Cuando se previene esa acumulación, ya sea por medio de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas o por medio de células mutadas que carecen de las enzimas biosintéticas, se deterioran las funciones celulares, como ya lo hemos visto.

Sin embargo, el papel crítico que desempeñan las poliaminas en estas funciones, todavía no se ha apreciado claramente. En parte se debe al hecho de que se presentan muchas dificultades en el estudio de estas moléculas debido a su ambigüedad, su alta carga y además, a que sus correlaciones funcionales específicas no son fácilmente discernibles (81).

El aislamiento e identificación de las enzimas involucradas en su biosíntesis ha progresado con gran éxito y ahora se conoce la extensa regulación involucrada en la biosíntesis de poliaminas.

Todos los genes de las enzimas claves han sido clonados y expresados en Escherichia coli. La estructura cristalográfica de estas enzimas estará disponible en un futuro cercano y las secuencias y estructuras específicas de ácidos nucleicos correspondientes a las poliaminas en términos de regulación han sido identificados (81).

Todavía es un concepto intrigante la posibilidad de que estas secuencias sean incorporadas a otros materiales genéticos para conferir una regulación por medio de sus productos biológicos (81). Sin embargo, conforme los descubrimientos se van acercando al entendimiento de la biología molecular de estas enzimas y de su extraordinaria regulación, nos debemos enfocar nuevamente en el producto final de este mecanismo biosintético, las poliaminas por sí mismas, y a sus funciones celulares.

Las poliaminas son únicas no solamente por su amplia regulación, sino también a que la carga en una poliamina está distribuida en el espacio, separada por distancias atómicas específicas, contrastando con las cargas puntuales provistas por magnesio, calcio, etc; como otros cationes, sus funciones reales y potenciales son numerosas.

Se han descrito adecuadamente sus interacciones con ácidos nucleicos, proteínas, membranas y otros organelos intracelulares, a pesar del hecho de que la naturaleza exacta de estas interacciones actualmente está siendo dilucidada (81).

La habilidad de las poliaminas para inducir cambios conformacionales en ácidos nucleicos, puede estar relacionado a mecanismos de control genético. El compuesto fisiológico que es capaz de inducir transiciones B y Z en ácidos nucleicos es la espermina, un compuesto disponible en células de mamíferos en altas concentraciones (81).

Parece ser que las pollaminas juegan un doble papel, estabilizando estructuras de membranas y también facilitando realmente la formación de estructuras específicas.

En este trabajo se ha dado énfasis al incremento que presentan las pollaminas en estados patológicos como el cáncer, aunque también se han encontrado niveles altos en otras enfermedades que involucran proliferación o muerte celular, condiciones inflamatorias e infecciones tanto virales como bacterianas.

Por esta razón, el uso del análisis de pollaminas como un medio de diagnóstico puede llegar a ser de gran utilidad, pese a que ha sido ampliamente criticado debido a la posibilidad de resultados falso-negativos.

Sin embargo, la medición de los niveles de pollaminas debe ser utilizado como un examen preliminar, realizando análisis más detallados a los pacientes que muestren niveles elevados.

En el pasado, se obtenían más resultados falso-negativos que en la actualidad, ya que las técnicas se han ido perfeccionando y lo seguirán haciendo conforme avance la tecnología.

Por otra parte, los avances en la investigación en la bioquímica de pollaminas podrían proveer de un medio eficaz de control de enfermedades proliferativas, donde los efectos adversos del tratamiento podrían reducirse en forma considerable mejorando las condiciones de vida de muchos pacientes.

Las funciones de las poliaminas están siendo dirigidas actualmente utilizando técnicas de biología molecular, inhibidores específicos de la biosíntesis de poliaminas (disponibles actualmente para virtualmente todas las enzimas de la ruta biosintética), y más recientemente con el uso de análogos de poliaminas.

Estos análogos pueden interactuar en sitios específicos en competencia con las poliaminas nativas, pero pudieron haber alterado la función en dichos sitios (81).

Sin embargo, hay diversas áreas importantes de la investigación en la bioquímica de poliaminas que deben ser consideradas (81):

- Un gran impedimento metodológico es la inhabilidad para discernir la distribución subcelular y la compartimentación de las poliaminas, se han realizado estudios en este campo en células no-mamíferas (82), pero es esencial extender estos estudios a células de mamíferos.
- Existen mecanismos de transporte celular específicos para la entrada y el flujo de poliaminas. La función, regulación y la posible utilización de este mecanismo para la distribución a nivel celular de agentes quimioterapéuticos son un campo fuerte de la investigación actual. Estos estudios serán facilitados por la clonación y expresión de transportes de proteínas y su comparación con otros transportadores.
- Todavía no se ha aclarado si el análisis de los productos oxidados del metabolismo de espermidina, que da un aumento en la isoputrescina

hidrolizada eliminará estos resultados falso-negativos y será un medio de diagnóstico más confiable que la espermidina por sí misma.

El uso de mutantes en el campo de estudio de las poliaminas ha sido muy importante, particularmente con referencia a bacterias y levaduras, y la extensión de estos estudios a células de mamíferos podrían ayudar a canalizar muchas áreas de interés.

Debido a la diversidad de funciones que tienen las poliaminas en el desarrollo, crecimiento y envejecimiento de las plantas. El progreso en la investigación de estos compuestos será de fundamental importancia en el entendimiento de los procesos naturales que regulan la actividad celular y el desarrollo.

Además, estas investigaciones pueden proporcionar medios adicionales por los cuales el crecimiento celular pueda ser controlado artificialmente, por medio de inhibidores específicos en la biosíntesis de poliaminas (55).

La biosíntesis de poliaminas responde a una gran variedad de señales intracelulares, incluyendo a las generadas por factores de crecimiento, hormonas, promotores tumorales y oncogenes. La biosíntesis de poliaminas es regulada a muchos niveles, y los mecanismos por los cuales las rutas de transducción de señales ejercen su influencia son actualmente un área de gran interés.

Además, un papel biológico de las poliaminas "per se" puede influenciar pasos moleculares específicos de rutas particulares de transducción de señales.

- Se ha planteado una hipótesis de que los productos de la oxidación de poliaminas pueden ser regulados (83), que aunque se basa en la necesidad de expansión y datos significantes, es una noción interesante que merece consideración.
- Se tienen importantes evidencias de las interacciones entre las poliaminas y los ácidos nucleicos, pero con cada descubrimiento surgen nuevas dudas acerca del papel de las poliaminas en este campo. Por ejemplo: La forma en que es afectada la conformación del DNA y los procesos biológicos relacionados con las concentraciones intracelulares de poliaminas (93); Los efectos de las poliaminas y de sus análogos en células vivientes y en secuencias de los ácidos nucleicos derivados de estas células (93).
- Así mismo, los avances en la investigación de la bioquímica de poliaminas ha dado lugar a nuevas dudas en áreas relacionadas. Investigaciones de la cromatina y el núcleo pueden proveer intuiciones de cómo las poliaminas afectan detalles estructurales de genes específicos en formas naturales (93).

Otros estudios de genes específicos permitirá determinar si las alteraciones producidas, aparentemente por poliaminas, en DNAsas y en

cromatina están asociadas estructuralmente con cambios en la regulación de la transcripción o con la síntesis (94).

- Existe un interés significativo en estudiar las interacciones entre las poliaminas y los ácidos nucleicos. Las poliaminas regulan las conformaciones de los ácidos nucleicos "in vitro" y podrían tener un papel similar "in vivo". Sin embargo, los progresos en este campo dependen de interacciones productivas a nivel multidisciplinario (93).

El conocimiento obtenido en las investigaciones de ciencia básica de estos compuestos se ha ampliado a resultados clínicamente relevantes. El monitoreo de poliaminas en fluidos fisiológicos y en células rojas se relaciona biológicamente y puede revelar clínicamente la presencia de tumores y de otros estados patológicos.

La observación de que los tumores, como entidades de rápido crecimiento, contienen altos niveles de poliaminas es la base de estudios de diagnóstico. El hecho de que la inhibición de la biosíntesis de poliaminas puede reducir el crecimiento celular se ha enfocado a aplicaciones terapéuticas.

Para enfermedades parasitarias y cáncer, los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas y los análogos de poliaminas ha provisto nuevas herramientas terapéuticas prometedoras. La capacidad de ir libremente del laboratorio de ciencia básica a la aplicación clínica y viceversa ha sido otro elemento intrigante en el campo de la investigación en poliaminas.

Se han utilizado técnicas de biología molecular para desarrollar y entender la diferencia de sensibilidad de un inhibidor de la ornitina descarboxilasa, difluorometionina, entre tripanosomas y células de mamíferos (84). El tripanosoma es extremadamente sensible a este inhibidor, mientras que las células de mamíferos son mucho menos sensibles. Un entendimiento en la construcción de la molécula de ornitina descarboxilasa da por lo menos parte de la respuesta.

El futuro de la investigación en la bioquímica de poliaminas es brillante. La traducción de datos del laboratorio de ciencia básica en la esfera clínica no solamente se ha logrado, sino también parece ser que va a ser ampliado en forma extensa.

Muchos científicos utilizan poliaminas libremente en sus protocolos experimentales con o sin conocimientos, ya sea para cristalizar ácidos nucleicos, realizar reacciones con endonucleasas o cuando utilizan sistemas lisados de reticulocitos que son ricos en poliaminas. No obstante, ha llegado el momento de entender sus funciones.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Méndez, J.D.: Poliaminas. En: *Bioquímica e Inmunología*. Hicks, J.J. y Zagoya, J.C. (Eds). Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F., 1989, Vol.2, p.p. 366-385.
- 2) Mann, T. and Lutwak, C.: Male reproductive function and the composition of semen: General considerations in: *Male Reproductive Functions and Semen*. Mann, T. (Ed), John Wiley & Sons, New York, USA, 1981, p.p. 1-11.
- 3) Morgan, L.M.D.: Polyamines. *Essays In Biochemistry*, 23: 83-113, 1987.
- 4) Pegg, E.A.: Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 334: 249-262, 1990.
- 5) Heby, O. and Persson, L.: Molecular genetics of polyaminic synthesis in eukaryotic cells. *T.I.B.S.* 15: 153-158, 1990.
- 6) Morris, R.D.A.: New perspective on ornithine decarboxylase regulation: Prevention of polyamine toxicity is the overriding theme. *J. Cell. Biochem.* 46: 102-105, 1991.
- 7) Sheth, R.A. and Moodbidri B.S.W.: Significance of polyamines in reproduction. *Adv. Sex. Horm. Res.* 3: 51-74, 1977.
- 8) Lehninger, A.L.: *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc., New York, 1988 and 1993.
- 9) Spector, B.E.: Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochem. Med.* 28: 165-175, 1982.
- 10) Méndez, J.D. y Hicks, J.J.: Metabolismo de poliaminas en microorganismos. *Rev. Soc. Quím. Mex.* 31 (1, 2, 3): 4, 1987.
- 11) Zemecka, E., and Porembaska, Z.: Five forms of arginase in human tissues. *Biochem. Med. Met. Biol.* 39: 258-266, 1988.
- 12) Kaysen, G.A. and Strecker, A.J.: Purification and properties of arginase of rat kidney. *Biochem. J.* 133: 779-788, 1973.
- 13) Fujimoto, M., Kameji, T. and Kanaya, A.: Purification and properties of rat small intestinal arginase. *J. Biochem.* 79: 441-449, 1976.
- 14) Harri, M. and Hartjala, K.: Arginase activity in rat small intestinal mucosa. *Acta. Physiol. Scand.* 89: 126-128, 1973.

- 15) Sadasivudu, B. and Indira, H.R.: Distribution of the rat enzymes involved in the disposal of arginine and ornithine in different regions of rat brain. *Brain. Res.* 79: 326-329, 1974.
- 16) Mastuzaki, S., Suzuki, M. and Hamana, K.: A possible role of arginase in the regulation of polyamine biosynthesis in rat thyroid. *Acta. Endocrinológica.* 98: 57-61, 1981.
- 17) Brown, V.K.H. and Box, V.L.: The influence of some alicyclic hydrocarbons on the arginase activity of guinea pig skin. *Br. J. Derm.* 85: 432-436, 1971.
- 18) Cotton, D.W.K. and Mier, P.D.: Role of arginase in the epidermis. *Nature (London)* 252-616, 1974.
- 19) Herzfeld, A. and Raper, S.: The heterogeneity of arginase in rat tissues. *Biochem. J.* 153: 469-478, 1976.
- 20) Glass, R. and Knox, E.: Arginase isoenzymes of rat mammary gland, liver and other tissues. *J. Biol. Chem.* 248: 5785-5789, 1973.
- 21) Carvajal, N., Martínez, J. and Fernández, M.: Immobilized monomers of human liver arginase. *Biochem. Biophys. Acta.* 481: 177-183, 1977.
- 22) Baldwin, R.L. and Milligan, L.P.: Enzymatic changes associated with the initiation and maintenance of lactation in the rat. *J. Biol. Chem.* 241: 2058-2065, 1966.
- 23) Folley, S.J. and Greenbaum, A.L.: Changes in the arginase and alkaline phosphatase contents of the mammary gland and liver of the rat during pregnancy, lactation and mammary involution. *Biochem. J.* 41: 261-268, 1947.
- 24) Cabello, J., Basillo, C. and Prajoux, U.: Kinetic properties of erythrocyte and liver arginase. *Biochem. Biophys. Acta.* 48: 148-152, 1961.
- 25) Klein, D. and Morris, D.R.: Increased arginase activity during lymphocyte mitogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 199-204, 1978.
- 26) Alhonen-Hongisto, L., Seppänen, P., Holttä, I. and Janne, J.: Replacement of natural polyamines by cadaverine and its aminopropyl derivatives in Ehrlich ascites carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106: 291-297, 1982.

- 27) Beruter, J., Colombo J., and Bachmann, C.: Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes. *Biochem. J.* 175: 449-454, 1978.
- 28) Ugarte, G., Pino, M.D., Pino, M.E., Pelrano, P. and Marusi, F.: Serum arginase activity in subjects with hepato-cellular damage. *J. Lab. Clin. Med.* 55: 522-528, 1960.
- 29) Noonan, N.E. and Dennis, J.M.: Use of plasma arginase and γ -glutamyl transpeptidase as specific indicators of hepatocellular or hepatobiliary disease in the dog. *Am.J. Vet. Res.* 140 (7): 942-947, 1979.
- 30) Rodríguez, C.A., Nuñez, C.J., Peláez, R.J., y Conde, R.L.: Actividad arginásica en enfermedades cardiorpulmonares. *Rev. Clin. Esp.* 124: 369-374, 1972.
- 31) Rodríguez, C.A., Mora, L.R.J., Morata, F.G. y Peláez, R.J.: Accidentes vasculares del encéfalo. Valor de la arginasa sérica en el diagnóstico diferencial. *Rev. Clin. Esp.* 124: 369-374, 1972.
- 32) Stewart, J. and Charon, H.: Arginase of mouse brain and liver. *J. Neurochem.* 29: 657-663, 1977.
- 33) Farron, F.: Arginase isoenzymes and their directions by catalytic staining in starch gel. *Anal. Biochem.* 53: 264-268, 1973.
- 34) Tarrab, R., Rodríguez, J., Hultron, C., Palacios, R., and Soberón, G.: Molecular forms of rat liver arginase. Isolation and characterization. *Eur. J. Biochem.* 457-458, 1974.
- 35) Carvajal, N., Venegas, A., Oestreicher, G., and Plaza, M.: Effect of manganese on the quaternary structure of human liver arginase. *Bioch. Biophys. Acta.* 250: 437-442, 1971.
- 36) Middelhoven, W.J.: The ferrous ion as the cofactor of arginase metallo-complexes of known composition and of native arginase. *Biochem. Acta.* 191: 110-121, 1969.
- 37) Hirsch-Kolb, H., Kolb, H.J., and Greenberg, D.M.: Nuclear magnetic resonance studies of manganese binding of rat liver arginase. *Anal. Biochem.* 246: 395-401, 1971.
- 38) Hunter, A., and Downs, C.K.: The inhibition of arginase by aminoacids. *J. Biol. Chem.* 157: 427-446, 1945.

- 39) Schlimke, R.T.: Differential effects of fasting and protein free diets on levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem.* 237: 1921-1924, 1962.
- 40) Cedervaum, S.D., and Moedjono, S.J.: Treatment of hyperargininemia due to arginase deficiency with a chemically defined diet. *J. Inher. Metab. Dis.* 5: 95-99, 1982.
- 41) McLean, P., and Gurney, M.W.: Effect of adrenalectomy and growth hormone on enzymes concerned with urea synthesis in rat liver. *Biochem. J.* 87: 96-104, 1963.
- 42) Kesavarao, K.V., Raglupathi, R.R., and Swami, K.: The inhibition of sheep liver arginase by some L-aminoacids. *Int. J. Biochem.* 4: 62-70, 1973.
- 43) Reddy, P.U.M., and Ramaa Rao, J.V.: Inhibition of arginase in sheep brain homogenates by some L-aminoacids. *Experientia.* 37: 814, 1980.
- 44) Rosenfield, J.L., Dutta, S.P., Cheda, G.B. and Tritsch, G.L.: Purine and pyrimidine inhibitors of arginase. *Biochem. Biophys. Acta.* 410: 164-166, 1975.
- 45) Pegg A.E., and McCann, P.P.: Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* 243: 212, 1982.
- 46) Cohen, S.S.: What do the polyamines do?: News and Views. *Nature (London)* 274: 209-210, 1978.
- 47) Hougaard, M., Nielsen, H., and Larsson, L.: Localization and biosynthesis of polyamines in insulin producing cells. *Biochem. J.* 238: 46, 1986.
- 48) Cochet, C., Chambaz, E.M.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 30: 247-266, 1983.
- 49) Gomis, R., Sener, A., Malaisse-Lagae, F., and Malaisse, W.J.: Transglutamilase activity in pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Acta.* 760: 384-388, 1983.
- 50) Welsh, N., and Sjöholm, A.: Polyamines and insulin production in isolate mouse pancreatic islets. *Biochem. J.* 252: 701-707, 1988.
- 51) Lockwood, D.M., Lipsky, J.J., Meruk, F., and East, L.E.: Actions of polyamines on lipid and glucose metabolism on fat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44 (3): 600-607, 1971.

- 52) Hannonen, P., Raina, A., and Janne, J.: Polyamine synthesis in the regenerating rat liver: stimulation of S-adenosylmethionine decarboxylase and spermidine and spermine synthases after partial hepatectomy. *Biochem. Acta.* 273: 84, 1972.
- 53) Russell, D.H., and Snyder, S.H.: Amine synthesis in regenerating rat liver: Extremely rapid turnover of ornithine decarboxylase. *Mol. Pharmacol.* 5: 253, 1969.
- 54) Genedami, S., Piccinini, G. and Bertoli, I.A.: Putrescine has analgesic activity in rats. *Life. Sci.* 34: 2407, 1984.
- 55) Méndez, J.D., y Hicks, J.J.: Metabolismo y función de las poliaminas en las células vegetales. *Rev. Soc. Quím. Mex.* 27 (4): 169, 1983.
- 56) Williams-Ashman, and Lockwood, M.D.: Role of polyamines in reproductive physiology and sex hormone action. In: *metabolism and biological functions of polyamines.* Herbst, E., Bachrach, V. (Eds), *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA*, 171: 882-894, 1970.
- 57) Elgavish, A., Wallace, R.W., Pillion, D.J., and Meezan, E.: Polyamines stimulate D-glucose transport in isolated renal brush border membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Acta.* 777: 1-8, 1984.
- 58) Johnson, W.T., and Nordlie, R.: Stimulation glucose-6-phosphatase by polyamines is a membrane event. *Life. Sci.* 26 (4): 297-307, 1980.
- 59) Douds, P.A., Dunham, J., Bitenski, L., and Chayen, J.: Putrescine may be a natural stimulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *F.E.B.S. Letters* 201 (1): 105-108, 1986.
- 60) Méndez, J.D., y Hicks, J.J.: Las poliaminas y el sistema reproductor de la hembra. *Ginec. Obstet. Mex.* 302 (50): 157-164, 1982.
- 61) Méndez, J.D., y Hicks, J.J.: Metabolismo de las poliaminas en diferentes condiciones fisiológicas de la mujer. *Ginec. Obstet. Mex.* 325 (52): 133-138, 1984.
- 62) Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., y Ginsberg, H.S.: *Tratado de Microbiología*, 3a. edición, Ed. Salvat, 1984, Barcelona, España. 45, 226.
- 63) Russell, D.H.: Clinical relevance of polyamines. *CRC Crit.Rev. Clin. Lab. Sci.* 18 (3): 261, 1983.

- 64) Heby, O., and Persson, L.: Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *T.I.B.S.* 15: 153-158, 1990.
- 65) Haddox, M.K., and Haddock, D.R.: Ornithine decarboxylase expression in normal and neoplastic growth. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3. Caldarera, C.M., Zappia, V. and Bachrach, U. (Eds), Raven Press, New York, 275-286, 1981.
- 66) Veorhees, J.J.: Polyamines and psoriasis. *Arch. Dermatol.* 115: 943-944, 1979.
- 67) Fozard, J.R., and Koch-Weser, J.: Pharmacological consequences of inhibition of polyamine biosynthesis with DL-difluoromethylornithine. *Pharmacol. Sci.* 3 (3): 107-110, 1982.
- 68) Fozard, J.R., and Part, M.L.: Methods for the study of the experimental interruption of pregnancy by ODC inhibitors: effects of DL-DMFO. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 94, Tabor, H., and Tabor, C.W. (Eds) Academic Press, New York, 213-216, 1983.
- 69) Boutwell, R.K.: Evidence that an elevated level of ODC activity is an essential component of tumor promotion. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4., Bachrach, U., Kaye, A., and Chayen, R., (Eds), Raven Press, New York, 79-96, 1983.
- 70) Sjoerdsma, A., and Schechter, P.J.: Chemotherapeutic implications of polyamine biosynthesis inhibition. *Clin.Pharmacol.Ther.* 35 (3): 287-300, 1984.
- 71) Tyms, A.S., Rawal, B.K. Naim, H.M., and Williamson, J.D.: The antiviral effect of inhibitors of polyamine metabolism. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol.4, Bachrach, U., Kaye, A., and Chayen, R., (Eds), Raven Press, New York, 1983, 507-517.
- 72) Maron, L.J.: Polyamines and brain tumors: relationship to patient monitoring and therapy. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldarera, C.M., Zappia, V., and Bachrach, U. (Eds), Raven Press, New York, 1981, 425-430.
- 73) Tomas, T., and Kiang, D.T.: Additive growth inhibitory effects of DL-difluoromethylornithine and antiestrogens on MCF-7 breast cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143 (2): 424-430, 1987.

- 74) Scalabrino,G., Ferloli, M.E., Modena, D., and Puerari, M.: Levels of activity of polyamine biosynthetic decarboxylases as indicators of the degree of malignancy of human neoplastic tissues. In: *Advances In Polyamine Research*, Vol. 3, Caldarera, C.M., Zappia, V., and Bachrach, U. (Eds), Raven Press, New York, 1981, 451-462.
- 75) Marton, L.J., and Feuerstein,B.G.: Polyamine-DNA interactions: possible site of new cancer Chemotherapeutic Intervention. *Pharm.Res.* 3 (6): 311-317, 1986.
- 76) Janne, J., Alhonen-Hongisto, L., Seppanen, P., and Hottta, E.: Cellular compensatory mechanism during chemically induced polyamine deprivation. In: *Advances In Polyamine Research*, Vol. 3, Caldarera, C.M., Zappia, V., and Bachrach, U. (Eds), Raven Press, New York, 1981, 85-94.
- 77) Bustamante Olea, F.J.: Sistema tegumentario. UNAM. ENEP Itzacala, 168-170, 1984.
- 78) Saul, A.: Lecciones de Dermatología. Méndez Cervantes, F., (Eds), México, 1973, 271-174.
- 79) McCann, P.P., Bacchi, C.J., Hanson, W.L., Cain, G.D., Nathan, H.C., Hutner, S.H., and Sjoerdsma, A.: Effect on parasitic protozoa of DL-difluoromethylornithine- An inhibitor of ornithine decarboxylase. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldarera, C.M., Zappia, V. and Bachrach, U. (Eds), Raven Press, New York, 1981, 97-110.
- 80) McCann, P.P., Bacchi, C.J., Hanson, W.L., and Nathan, H.C.: Methods for the study of the treatment of protozoan diseases by inhibitors of ODC. In: *Methods in enzymology*, Vol. 4, Tabor, H., White Tabor, C., Hutner, S.H., and Sjoerdsma, A. (Eds), Academic Press. New York. 1983.
- 81) Marton, L.J., Pegg, A.E., and Morris, D.R.: Directions for polyamine research. *J. Cell. Biochem.* 45: 7-8, 1991.
- 82) Davis, H.R.: Management of polyamine pools and the regulation of ODC. *Prospect. J. Cell. Biochem.* 44: 199-205, 1990.
- 83) Coffino, P., and Poznanski, A.: Killer polyamines?. *Prospect. J. Cell. Biochem.* 45: 54-58, 1991.
- 84) Wang, C.C.: A novel suicide inhibitor strategy for antiparasitic drug development. *Prospect. J. Cell. Biochem.* 45: 49-53, 1991

- 86) Kahana, C., and Nathans, D.: Isolation of cloned cDNA encoding mammalian ornithine decarboxylase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81: 3645-3649, 1985.
- 87) Denhardt, D.T., Edwards, D.R., and Parfett, C.L.J.: Gene expression during the mammalian cell cycle. *Biochem. Biophys. Acta.* 865: 83-125, 1986.
- 88) Rollins, B.J., and Stiles, C.D.: Serum-inducible genes. *Adv. Cancer Res.* 53: 1-32, 1989.
- 89) Schimke, R.T.: *Adv. Enzymol.*: 37: 135, 1973.
- 90) Russell, D.H., and Durlé, B.G.M.: Polyamines as Biochemical Markers of Normal and Malignant Growth. New York: Raven Press, 1978.
- 91) Geiger, L.E., and Morris, D.R.: Stimulation of deoxyribonucleic acid replication fork movement by spermidine analogs in polyamine-deficient Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 141: 1192-1198, 1980.
- 92) Igarashi, K., and Morris, D.R.: Physiological effects in bovine lymphocytes of inhibiting polyamine synthesis with ethylglyoxal bis(guanyl-hydrazone). *Cancer Res.* 44: 5332-5337, 1984.
- 93) Feuerstein, B.G., Williams, L.D., Basu, H.S., and Maron, L.J.: Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions. *J. Cell. Biochem.* 46: 37-47, 1991.
- 94) Snyder, R.D.: Polyamine depletion is associated with altered chromatin structure in HeLa cells. *Biochem. J.* 260: 697-704, 1989.
- 95) Pegg, A.E.: S-adenosylmethionine decarboxylase: a brief review. *Cell Biochem. Funct.* 2: 11-15, 1984.
- 96) Chayen R.: Clinical chemistry of polyamines. *Cell Biochem. Funct.* 2: 15-19, 1984.
- 97) Russell, D.H.: Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. *Nature New. Biol.* 233: 144-145, 1971.
- 98) Sella, N., and Al-Therib, M.J.: Acetyl-CoA: 1,4-diaminobutane-N-acetyltransferase: Occurrence in vertebrate. 206-212, 1974.
- 99) Blankenship, J., and Wallé, T.: Acetylation of spermidine and spermine by rat liver and kidney chromatin. *Arch. Biochem. Biophys.* 179: 235-242, 1977.

- 100) Blankenship, J, and Walle, T.: "In vitro" studies of enzymatic synthesis and metabolism of N-acetylated polyamines. *Adv. Cancer Res.* 2: 97-110, 1978.
- 101) Abdel-Monem, M.M., Ohno, K., Fortuny, I.E., and Theologides, A.: Thin-layer chromatography and high-pressure liquid chromatography of the dansyl polyamines. In: *Advanced Polyamine Research*, Vol. 2. Koch-Weser, B., Knodgen, W., Richards, C., and Tardif, F.N. 1978. 37-49.
- 102) Seller, N., Bolkenius, Schechter, P., Tell, G., Marmont, P., Fozard, J., Bachrach, U., and Grosshans, E.: The significance of acetylation in the urinary excretion of polyamines. In: *Advanced Polyamine Research*, Vol. 3, Calderera, C.M., Zappia, V., and Bachrach, U., 1981. 197-211.
- 103) Zeller, E.A.: Zur Kenntnis der Diamin-Oxidase.3. Mitteilung über den enzymatischen Abbau von Polyaminen. *Helv. Chim. Acta.* 21: 1645-1665, 1938.
- 104) Seller, N., Knodgen, B., and Haegeler, K.: N-(3-aminopropyl) pyrrolidin-2-one, a product of spermidine catabolism "in vivo". *Biochem. J.* 208: 189-197, 1982.
- 105) Seller, N., Summers, W.C., and Canellakis, Z.N.: Diamine oxidase and polyamine catabolism. In: *Advanced Polyamine Research*, Vol. 4, Tabor, H., White-Tabor, C., Hutner, S.H., and Sjoerdsma, A. 135-154, 1983.
- 106) Asatoot, A.M.: Isolation and characterization of a new urinary metabolite derived from spermidine. *Biochem. Biophys. Acta.* 586: 55-62, 1979.
- 107) Sufrin, J.R., Lombardini, J.B., and Keith, D.D.: A potent inhibitor of the enzymatic synthesis of S-adenosylmethionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106 (2): 251-255, 1982.
- 108) Lacy, J., Summers, W.C., and Canellakis, A.N.: Effects of diacetyl diamines on "in vitro" activation and proliferation of human B lymphocytes. *J. Immunol.* 135 (6): 3772-3776, 1985.
- 109) Canellakis, Z.N., and Bondy, P.K.: Polyamines metabolism in differentiating friend erythroleukemia cells. *Cancer Res.* 44B: 3841, 1984.
- 110) Canellakis, Z.N.: Effects of acetylated polyamines on ornithine decarboxylase in rat HTC cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100: 929, 1981.

- 111) Canelakiss, Z.N., Lande, L.A., and Bondy, P.K.: Factors modulating the activity of ornithine decarboxylase in rat HTC cells. *Med. Biol.* 59: 300, 1981.
- 112) Ganem B.: New chemistry of naturally occurring polyamines. *Acc. Chem. Res.* 15: 290 - 298, 1982.
- 113) Thomas, E.W., Cudahy, M.M., Spillman, C.J., Dinh, D.M., Watkins, T.L., and Vidmar, T.J.: Cholesterol lowering bile acid binding agents: Novel lipophilic polyamines. *J. Med. Chem.* 35: 1233-1245, 1992.
- 114) Bowlin, T.L., Rosenberg, A., Stemerick, D., and Edwards, M.L.: Potentiation of natural cell activity and tumor immunity by diacetylputrescine. *Cancer Res.* 50: 5460 - 5463, 1990.
- 115) Bergeron, R.J., Nelms, A.H., McManis, J.S., Hawthorne, T.R., Vinson, J.R., Bortell, R., and Ingeno, M.J.: Synthetic polyamine analogues as antineoplastics. *J. Med. Chem.* 31 (6): 1183 - 1190, 1988.
- 116) Bachrach, U.: Physiological aspects of ornithine decarboxylase. *Cell. Bloch. Func.* (2): 6 - 10, 1984.