

33
20



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION TOXICOLOGICA DEL ACIDO
2-AMINO-5-YODOACETAMIDO PENTANOICO
(AYAP)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARIA DEL PILAR PASTOR ALVAREZ

DIRECTORES DE TESIS:

DR EN C. RICARDO YAÑEZ AVILA
O.F.B. MARICELA NOE MARTINEZ



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.

I N D I C E

1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVO	1
3. ANTECEDENTES	1
4. PARTE EXPERIMENTAL	10
5. MATERIAL BIOLOGICO	13
6. DETERMINACION DE LA DL_{50} EN RATON VIA INTRAPERITONEAL.....	14
7. DETERMINACION DE LA DL_{50} EN RATA WISTAR VIA INTRAPERITONEAL E INTRAMUSCULAR.....	15
8. DETERMINACION DE LA TOXICIDAD SUBAGUDA EN RATA WISTAR VIA INTRAMUSCULAR.....	16
9. DETERMINACIONES CLINICAS	17
10. RESULTADOS.....	28
11. GRAFICAS	32
12. CONCLUSIONES	40
13. BIBLIOGRAFIA.....	42

EVALUACION TOXICOLOGICA DEL ACIDO 2-AMINO-5-YODOACETAMIDO PENTANOICO.

INTRODUCCION.

Estudios llevados a cabo sobre el papel de la ornitina descarboxilasa (ODC), en la biosíntesis de poliaminas (putresina, espermina y espermidina) y de éstas sobre la biosíntesis de DNA, en el crecimiento y proliferación celular ha sido el motivo para realizar investigaciones relacionadas con la síntesis de posibles inhibidores de esta enzima (ODC). El ácido 2-amino -5-yodoacetamido pentanoico (AYAP) - fue sintetizado como un posible inhibidor selectivo e irreversible - de la enzima ODC. Comprobando su actividad inhibitoria en el desarrollo embrionario en rata por administración intrauterina (Méndez, J. - 1984) (28), e in vitro en hígado de rata (Wong, 1984).

OBJETIVO.

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo es estudiar la toxicidad del AYAP para determinar la dosis letal media y las alteraciones de la toxicidad subaguda, y determinar las dosis que debe ran utilizarse con fines terapéuticos y conocer las manifestaciones tóxicas generales del fármaco.

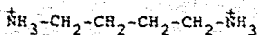
ANTECEDENTES.

Las poliaminas se encuentran distribuidas en todos los seres vivos, encontrándose en animales, bacterias, levaduras y vegetales en cantidades variables. Su historia se inicia en 1678, con el descubrimiento realizado por Antoni Van Lewenhock (2), en muestras de semen, quien observó después de varios días de reposo la aparición de diminutos cristales, que denominó "cristales de espermina", por su proceden-

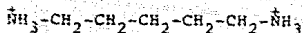
cia . Estos compuestos permanecieron olvidados por muchos años, pero el interés por estudiar las funciones de las poliaminas renació cuando Rozanski y Gurevith (1949)(2), en Israel, informaron que el semen humano era capaz de inhibir el crecimiento de varias bacterias y demostraron que el principio activo era la espermina.(2).

La putrescina (1,4-diaminobutano), cadaverina (1,5-diaminopentano), espermidina (N-(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano) y espermina (N-N'-bis(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano), son compuestos designados genéricamente con el nombre de poliaminas, fig. (1), y se han asociado a funciones relacionadas con la diferenciación y crecimiento celular. (2).

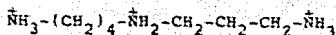
Fig. (1) ESTRUCTURA DE LAS PRINCIPALES POLIAMINAS.



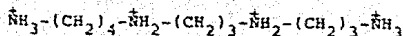
PUTRESCINA



CADAVERINA



ESPERMIDINA



ESPERMINA.

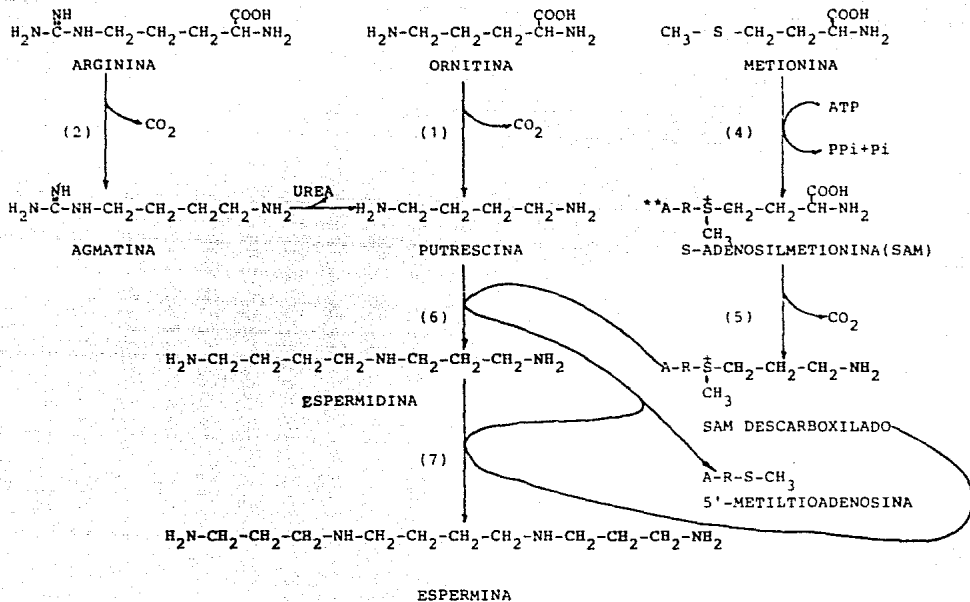
Las poliaminas constituyen un grupo de compuestos orgánicos que se caracterizan por tener varios átomos de nitrógeno en forma de grupo amino, unido a átomos de carbono, con un par de electrones no compartido en el nitrógeno, comportándose por lo tanto, como base de Lewis (donadora de pares de electrones), de aquí que a pH fisiológico las poliaminas se comporten como policationes, lo cual constituye una propiedad muy importante que ayuda a explicar su función biológica. (2)

El conocimiento de las vías biosintéticas de las poliaminas se ha centrado en la biosíntesis de putrescina, espermidina y espermina. Los pasos biosintéticos se muestran en la fig. (2), se observa que los aminoácidos L-ornitina, L-arginina y L-metionina son precursores en la biosíntesis de espermidina y espermina. (2)

La formación de putrescina se efectúa principalmente por descarboxilación de la ornitina, por la ornitina descarboxilasa (reacción 1) que depende de fosfato de piridoxal. Otra vía para la formación de putrescina, es la descarboxilación de la arginina por la arginina descarboxilasa vía agmatina (reacción 2). Esta descarboxilasa también depende de fosfato de piridoxal. A continuación la agmatina se hidrolisa por la agmatina-urehidrolasa para dar putrescina y urea (reacción 3). La ornitina y arginina descarboxilasa son inhibidas y reprimidas por la putrescina y espermidina.

La putrescina está presente en todas las células y todas son capaces de convertirla en espermidina, y alguna en espermina. Esta síntesis requiere putrescina y S-adenosilmetionina descarboxilasa; la espermina se forma por la acción secuencial de la metionina adenosil transferasa y S-adenosilmetionina respectivamente (reacciones 4 y 5). Finalmente, la síntesis de espermidina y espermina se logra por una reacción en la que se transfiere un grupo propil-

Fig. (2) Biosíntesis de poliaminas: putrescina, espermidina, y espermina.

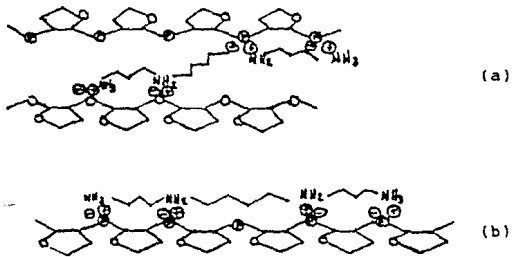


**A-R : ADENINA-RIBOSA.

amínico de la S-adenosilmetionina descarboxilasa al grupo amino de la putrescina o al grupo amino de la espermidina (reacciones 6 y 7) por una aminopropil transferasa de la que no se conocen cofactores.

Las características fisicoquímicas de las poliaminas al pH fisiológico como policationes explica el que puedan interactuar con diferentes macromoléculas como fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que poseen grupos con carga negativa y esto altera sus propiedades biológicas. Se planteó la hipótesis de que la actividad biológica de las poliaminas se debe a su estructura policationica lo que explica su gran afinidad por los ácidos nucleicos, al neutralizar las cargas negativas de los iones fosfatos (Tabor y Tabor, 1960) Fig. 4. Además de interactuar por enlaces electrostáticos, las poliaminas se unen por puentes de hidrógeno (Dubin y Ames, 1960). De este modo la síntesis y actividad de estas moléculas puede influir en la proliferación y crecimiento celular (Williams, 1981). (5)

Fig. (4) Ejemplos de interacciones de las poliaminas con el DNA. Se muestran sólo las interacciones de la espermina, las de espermidina serían similares y putrescina sólo interactúa según el modelo (b).



La ornitina descarboxilasa regula la concentración de poliaminas y, a su vez, se afecta por varios moduladores positivos y negativos (Canellakis, 1981, como los adenosin monofosfatos cíclicos (AMPC), acetilserpentina, inducen la actividad de la ODC, mientras que la antiennina (purificada a partir de hígado de rata y E.coli) disminuye la actividad de la descarboxilasa de ornitina (Birckbichler, 1977). Por lo anterior se considera que el control de la actividad de ODC, puede ser importante en el estudio de las enfermedades neoplásicas. (2)

Se ha demostrado que tanto en animales como en hombre el paso limitante en la síntesis de poliaminas es la descarboxilación de la L-ornitina por acción de la ornitina descarboxilasa (ODC). Siendo la biosíntesis de poliaminas un evento obligado previo a la proliferación celular, ya sea, en cultivo de células, tejidos en regeneración, tejidos embrionarios, células tumorales, etc. (Inoue y col.1975), se sugiere que la inhibición de esta enzima, puede disminuir la velocidad de proliferación celular (Pagg y col.1981), ya que existe una correlación directa en la proliferación celular y los niveles de L-ornitina descarboxilasa (Williams y col. 1972). (28)

Con este objetivo se han sintetizado una serie de compuestos inhibidores de la ornitina descarboxilasa, entre los que destaca la alfa-metil-ornitina, inhibidor competitivo (Mamont, 1976) y la DL-alfa difluorometilornitina, inhibidor tipo "suicida" y en consecuencia irreversible (Fozard, 1980 y Williams-Ashman, 1972). (14)

Se ha demostrado que la inhibición selectiva e irreversible de la ornitina descarboxilasa por la DL-alfadifluorometilornitina, y la consecuente disminución intracelular de poliaminas, suprime la inducción de carcinomas experimentales de colon, pancreático, mamario y renal (Malt, 1985). Así mismo, se ha comprobado que este compuesto es tóxico para células en cultivo de melanoma B16 (Sunkara, 1985) y de cáncer de colon y pulmonar (Abeloff, 1986). También se ha observado efecto anti-neoplásico favorable con la terapéutica combinada de nitroso-urea e inhibidores de la biosíntesis de poliaminas: DL-alfa-difluorometilornitina y metilglicoxal-bis-quanilhidrazona (Fujimoto, 1986). (14)

Siguiendo la teoría de los antimetabolitos neoplásicos de Baker (Baker, 1967), en el Departamento de Bioquímica y Biofísica de la Escuela Superior de Medicina, del Instituto Politécnico Nacional, se han diseñado y sintetizado una serie de compuestos que conservan las características que deben poseer los inhibidores selectivos e irreversibles de una enzima: Una parte de la molécula similar estructuralmente al sustrato natural y, por lo tanto, capaz de ocupar el sitio activo, y, un grupo alquilante capaz de unirse covalentemente a la enzima. (5)

En esta serie de compuestos se encuentra el ácido 2-amino-5-yodoacetamido pentanoico, fig. (5), que reúne las características estructurales para actuar como inhibidor selectivo irreversible de la L-ornitina descarboxilasa, fig. (6)

Fig.(5) Acido 2-amino-5-yodoacetamido pentanoico (AYAP).

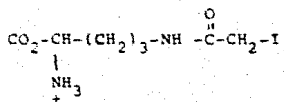
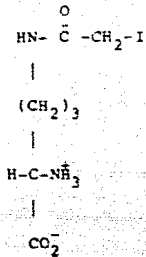
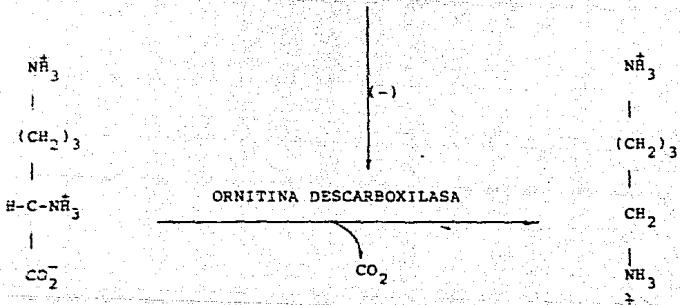


Fig.(6) Sustrato natural e inhibidor de la actividad de Ornitina Descarboxilasa (ODC).



Acido 2-amino-5-yodoacetamido
pentanoico (AYAP).



L-Ornitina

Putrescina

PARTE EXPERIMENTAL

TOXICIDAD AGUDA.

La prueba de toxicidad aguda tiene por objeto descubrir los efectos tóxicos ocasionados por una sola administración del AYAP. Se observó el efecto del fármaco en la conducta y locomoción del animal y la aparición de algunos síntomas. Empleándose como índice la dosis letal media (LD_{50}) que indica la dosis del compuesto que produce la muerte en el 50% de los animales de experimentación.

Estos estudios se efectuaron comúnmente en ratones y ratas, usando diferentes vías de administración (intramuscular e intraperitoneal). Después de administrar el AYAP, se observaron cuidadosamente los animales durante varias horas, registrando todos los síntomas que se presentaron y colocándose en una escala arbitraria preestablecida. Las observaciones fueron cuidadosas y siempre en las mismas condiciones. Se registraron el número de muertes y el tiempo en que ocurrieron. Se realizó necropsia a los animales que murieron con descripción macroscópica detallada de los órganos, registrando peso de: hígado, riñón y corazón. Los animales sobrevivientes fueron observados por dos semanas después de administrar el medicamento y al finalizar este tiempo se sacrificó una muestra estadísticamente significativa y se realizó necropsia. La determinación de la dosis letal es útil para determinar el margen de seguridad o índice terapéutico del compuesto, siendo este el cociente DL_{50}/DE_{50} .

TOXICIDAD SUBAGUDA

Ya determinada la LD₅₀ se estudió la toxicidad subaguda, en esta, los medicamentos no se administraron en una sola ocasión, sino que se administraron por períodos prolongados, de manera que la exposición en los animales se prolongó más tiempo. En general, se administraron dosis bajas del fármaco en forma constante y prolongada y poder llegar en un momento dado a alcanzar concentraciones tóxicas y manifestación de los síntomas, ya que muchas alteraciones que no aparecen con una sola administración pueden presentarse con pequeñas dosis sucesivas, ya sea, por la acción prolongada del fármaco en los órganos sensibles, por acumulación, o por modificación del fármaco por mecanismos enzimáticos.

Para este estudio se empleó rata Wistar vía intramuscular. Las dosis se dedujeron de los estudios de toxicidad aguda, considerando los síntomas registrados y datos histopatológicos que indican alteración de las funciones de órganos específicos. La exposición de los animales al fármaco fué por 90 días.

Durante el período de toxicidad subaguda se midieron diversos parámetros como son : medida de la actividad enzimática en el suero de los animales tratados como: transaminasa glutámico pirúvica (TGP), transaminasa glutámico-oxalacética (TGO), creatinofosfosinasa (CPK), además proteínas séricas totales, y sus fracciones. Alteraciones en estos parámetros indican alteraciones en órganos clave como hígado, riñón, corazón y músculo esquelético (Wroblewski, 1957). El órgano más afectado por uso y abuso de fármacos es el hígado. Considerando que ninguna prueba

en forma aislada es suficiente para aclarar alteraciones, al final del experimento, los animales sometidos a toxicidad subaguda se estudiaron histopatológicamente.

Existen varios métodos para evaluar estadísticamente los efectos de un fármaco, generalmente se presentan como bioensayos del todo o nada : Método gráfico de Litchfield y Wilcoxon (Lichfield, 1949), el análisis probit, de Gadmun Bliss Finney (Finney, 1952), y el que se usó en este trabajo fué el método Logit de Berkson (Berkson, 1953) (8).

MATERIAL BIOLÓGICO

Animales de experimentación:

Los animales de experimentación utilizados fueron ratones machos de 20 a 25 g de peso de la cepa Balb/c y ratas machos albinas de la cepa Wistar de 140 al 170 g; estos animales fueron proporcionados y mantenidos durante la evaluación toxicológica en el bioterio de la Escuela Superior de Medicina del IPN.

EQUIPO.

Para la administración del fármaco se utilizaron jeringas de 1 ml y agujas de tuberculina.

Para la extracción de sangre por vía lacrimal, se utilizaron pipetas Pasteur de vidrio Pyrex.

Para pesar los animales se utilizó una balanza granataria Ohaus con canastilla.

Para determinar las proteínas séricas totales se utilizó el espectrofotómetro UV, marca Varian Techtron 635.

Las determinaciones enzimáticas se realizaron en el multi-analizador biromático ABBOTT ABA-50.

Los reactivos utilizados para determinar actividad enzimática y proteínas séricas totales fueron de la casa ABBOTT.

La determinación de las diferentes proteínas por electroforesis se realizó en tiras de acetato de celulosa de la casa Gelman (Sepraphore III de 2.0 x 11.5 cm), y se utilizó como revelador rojo de Ponceau. La cámara de electroforesis fué de la misma marca.

Los reactivos utilizados para realizar las reacciones que se describen en este trabajo fueron de la máxima pureza accesible en el mercado.

DETERMINACION DE LA DL_{50} EN RATON Balb/c POR VIA INTRAPE- RITONEAL.

PRIMERA ETAPA.

Se formaron diez grupos de 2 ratones cada uno, cada grupo se marcó y se distribuyó al azar, con alimentación constante, temperatura de 22 a 24°C y ventilación adecuada. La administración de las dosis siguió una progresión geométrica desde 1 mg/kg hasta 128 mg/kg de peso. El fármaco se disuelve en agua destilada de tal manera que la dosis equivalente a 10 g de peso del ratón esté disuelta en 0.1 ml de agua destilada. Los animales se mantienen en observación durante las primeras horas después de administrar el fármaco y se registran los síntomas que se presenten durante las primeras 24 horas: se observan el efecto del medicamento en la conducta y locomoción del animal y la aparición de cualquier síntoma. Al cabo de 48 horas se determinan los animales muertos a una dosis determinada.

SEGUNDA ETAPA.

En base a los resultados obtenidos en la primera etapa se formaron cinco grupos de 4 animales cada uno y administrarán dosis de 70, 80, 90, 100, 110 mg/kg de peso, con el fin de establecer el rango en el que se mueren los animales tratados. Es importante no incluir en este rango LD_{100} y LD_0 . Se mantienen los mismos cuidados y control de los animales que en la primera etapa.

TERCERA ETAPA.

Se formaron cinco grupos al azar de 10 ratones cada uno y se administran dosis de 60, 72, 78, 84 mg/kg de peso respectivamente. este rango se establece después de haber ensayado diversas dosis en donde los animales presentan un efecto en el cual es posible evaluar y apreciar los efectos tóxicos que causa el fármaco en un plazo de 24 a 48 horas después de administrado éste.

Un grupo de 10 animales recibió solo agua destilada siendo este el grupo testigo. Se mantienen los mismos cuidados y observaciones en los animales como en la primera etapa, y se compararon las observaciones con el grupo testigo; a los animales que mueren en las primeras 48 horas, se les practica necropsia, con descripción macroscópica de hígado, corazón, riñón y pulmón, y de la zona de aplicación del fármaco, registrando peso de cada órgano. Los animales sobrevivientes se mantienen en observación por 15 días, al término de los cuales se sacrifican por desmenuamiento una muestra estadísticamente significativa realizando necropsia y observando si existe alteración en los tejidos y órganos mencionados.

DETERMINACION DE LA DL₅₀ EN RATA WISTAR: VIA INTRAPERITONEAL E INTRAMUSCULAR.

Se sigue el mismo procedimiento que en la primera etapa para determinar el rango adecuado de dosis, que fué de 32 a 48 mg/kg de peso por la vía intramuscular y por la vía intraperitoneal. Realizando así mismo el estudio histopatológico descrito.

DETERMINACION DE LA TOXICIDAD SUBAGUDA EN RATA WISTAR POR VIA INTRAMUSCULAR.

Las dosis para los estudios de toxicidad subaguda, se eligie - ron en base de la curva de dosis letal 50 obtenida en los estudios de toxicidad aguda. La dosis se eligieron de tal forma que la más baja de ellas no produzca síntomas aparentes de toxicidad en los animales durante el estudio, y la más alta, alrededor de la mitad de la LD₅₀, para evitar que aparezcan síntomas definidos de toxicidad.

En estos estudios se administro el fármaco por períodos prolongados y las observaciones durante el transcurso de la exposición al fármaco.

Se formaron cinco grupos de 10 animales cada uno y se administraron dosis de 4, 8, 12, 16 y 20 mg/kg de peso, por vía intramuscular, con exposición al fármaco por 180 días, de los cuales 90 días tu ieron una frecuencia de administracion de cada tercer día, y posteriormente se realizo una vez cada semana. Se observaron los síntomas tóxicos, en la conducta y locomoción del animal que provocho el fármaco en el transcurso de la administración.

A todos los animales que mueren se les efectuo necropsia completa, como se describió en la sección de toxicidad aguda. Los animales sobrevivientes se sacrificarón al término de los 180 días y se realizo la necropsia en la forma ya descrita.

Se llevo registro del peso de los animales tratados, y al término de este estudio se realizo una nueva administración de estas dosis, tomando muestras de sangre por vía lacrimal para realizar

los estudios de laboratorio ya mencionados. Se realizó también estudio histopatológico, a las 24 y 48 horas después de administrado el fármaco.

DETERMINACIONES CLINICAS.

Determinación de la concentración de proteínas séricas y actividad enzimática.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS SERICAS TOTALES.

Esta determinación se efectuó por el método de Lowry (Lowry, 1951) se basa en la reacción del cobre en medio alcalino con la proteína, y la reducción del reactivo de Folin Cilcateur (ácido fosfomolibdico, ácido fosfotungstico). Las muestras se tomaron por vía lacrimal y se centrifugaron a 3000 rpm.

REACTIVOS.

- a) Reactivo A (Solución de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio).
- b) Reactivo B (Solución de sulfato cúprico pentahidratado al 0.5% en citrato de sodio al 1%).
- c) Reactivo C (Mezclar 1 ml. del reactivo B con 50 ml. del reactivo A).
- d) Reactivo D (reactivo de Folin Cilcateur, diluido 1 a 3 con agua destilada).
- e) Solución tipo de proteínas (Albumina bovina a concentración de 0.5 % mg/ml).

METODO.

Se preparan diluciones de 50, 100, 150 y 200 ug/ml de albúmina bovina. A cada uno de los tubos se agrega 0.3 ml de reactivo A y 5 ml del reactivo C. Los tubos se agitan en vortex durante 30 segundos y se dejan reposar 10 minutos a temperatura ambiente; enseguida se agregan 0.5 ml de reactivo D y se agita nuevamente por 30 segundos, esta operación se hace en cada tubo. Se deja reposar 30 minutos y se lee en el espectrofotómetro a 660 nm., usando como testigo un tubo que contenga todos los reactivos excepto la proteína.

DETERMINACION CUANTITATIVA POR ELECTROFORESIS DE LAS FRACCIONES PROTEINICAS DEL SUERO.

La electroforesis es una de las técnicas analíticas más eficaces para aislar y purificar macromoléculas de fluidos biológicos. Todas las proteínas a un pH por debajo y por arriba de su punto isoelectrico poseen carga eléctrica positiva o negativa dependiendo de su estructura química, debido a esto cuando una proteína en solución se le hace pasar una corriente eléctrica migra hacia el polo de carga opuesta a una velocidad determinada, permitiendo separar y cuantificar las diferentes proteínas del plasma.

Reactivos

- a) muestra de suero
- b) solución reguladora de barbituratos pH 9.6 a concentración de 0.1M.

Las tiras de acetato de celulosa se equilibran con solución reguladora antes de aplicar la muestra, para lo cual se dejan flotar en la solución hasta que quede translúcida. Posteriormente se sumergen durante 15 minutos, se sacan las tiras, y se colocan sobre papel secante, se hace presión sobre la tira para eliminar el exceso de líquido; en un aplicador Gelman se colocan 5 ul de suero. El aplicador se coloca a 2 cm del extremo de la tira; se aplica la muestra de tal manera que se obtenga una banda delgada y uniforme perpendicular al flujo de la corriente. Las tiras se colocan en la cámara electroforética, que ha sido previamente llenada con 100 ml de solución reguladora a 5°C. La posición de las tiras debe ser la misma, y al colocarlas debe tenerse cuidado de no tocarla directamente con la mano para no contaminarlas.

La electroforesis se corre aplicando una corriente de 16 miliamperios y 4.6 voltios por tira, durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se sacan las tiras, eliminando el exceso de solución y se colocan en una cámara que contenga rojo de Ponceau, el cual contiene ácido tricloroacético, por lo que no requieren fijador, se dejan en el colorante por escurrimiento, y se somete a una serie de lavados con ácido acético al 5% hasta que la tira se haya decolorado, se secan las tiras al aire, y se leen en el densitómetro.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA (TGO).

La transaminasa glutámica oxalacética cataliza la transaminación del aspartato y alfa-cetoglutarato para producir oxalace-

tato y glutamato. La deshidrogenasa mállica (DHM) y NADH miden el oxalacetato producido por TGO a partir de aspartato y alfa-cetoglutarato. La velocidad de la desaparición de NADH y la disminución resultante en la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la cantidad de oxalacetato producida en el sistema. El piruvato es destruido por la deshidrogenasa láctica, evitando con ello su interferencia en las lecturas.

Reactivos.

- a) solución reguladora de fosfatos 80.0 mM/l a pH 7.4
- b) L-aspartato, 200 mM/l
- c) alfa-cetoglutarato 12 mM/l
- d) NADH + H⁺ 0.18 mM/l
- e) malato deshidrogenasa 0.6 UI/ml (0.5 mg de proteína/ml)

Método.

En una cubeta de 3.5 ml se colocan 2.3 ml de solución de L-aspartato, 0.05 ml de NADH + H⁺, 0.05 ml de DHM y 0.5 ml de suero, se mezclan y se dejan reposar por 10 minutos o hasta que haya adquirido una temperatura de 25°C. Se adiciona 0.10 ml de alfa-cetoglutarato y se determina la densidad óptica a 340 nm por cada dos minutos durante 10 minutos. El E./min., no debe exceder de 0.03; si no es así se diluye el suero 1 a 10 con solución reguladora de fosfatos. Al mismo tiempo se corre un blanco con todos los componentes de la reacción, excepto el sustrato, el volumen faltante se complementa con solución reguladora de fosfatos.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA.

El método de ensayo usado se basa en la medida de la concentración de ácido pirúvico, mediante la reacción acoplada midiendo la oxidación del NADH en presencia de deshidrogenasa láctica (Narmen, 1955).

Este método es el más sensible y específico. Se agrega al sistema un exceso de deshidrogenasa láctica y $\text{NADH} + \text{H}^+$ a medida que se forma piruvato es reducido a lactato con oxidación concomitante de $\text{NADH} + \text{H}^+$ a NAD^+ . Como la velocidad de esta transformación está controlada por TGP, la disminución de la absorbencia a 340 nm representa una medida de actividad de TGP.

Reactivos.

- a) regulador de fosfatos 80 mM/l pH 7.4
- b) L-alanina 66 mM/l
- c) alfa cetoglutarico 7 mM/l
- d) lactato deshidrogenasa 0.6 UI/ml

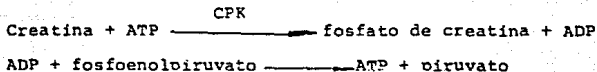
Método.

En una cubeta de 3.5 ml se colocan 1.92 ml de solución de alanina, 0.04 ml de $\text{NADH} + \text{H}^+$, 0.04 ml de LDH y 1 ml de suero. Se mezcla y se deja reposar 10 minutos o hasta obtener una temperatura de 25°C. Adicionar 0.10 ml de alfa cetoglutarato y determinar densidad óptica a 340 nm cada 2 minutos durante 10 minutos. El E/min. no debe exceder de 0.03; si no es así, diluir el suero 1 a 10 con solución reguladora de fosfatos. Al mismo tiempo se corre un blanco de reacción con todos los reactivos exceto

el sustrato. El volumen faltante se repone con agua bidestilada.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE FOSFOCREATINICINASA (CPK)

La valoración de esta enzima en suero tiene gran interés clínico para el diagnóstico de enfermedades del músculo esquelético y del cardíaco. La creatin-quinasa presenta 2 clases de subunidades, la M (muscular) y la B (cerebral) y, por consiguiente, hay tres posibles isoenzimas: la MM (CK₃), la MB (CK₂) y la BB (CK₁). En caso de alteración en algunos de los órganos mencionados se eleva la actividad creatinquinasa en suero sanguíneo. El método de elección para medir su actividad es el cinético, basado en las siguientes reacciones:



La actividad de CPK es proporcional a la velocidad de oxidación del NADH.

Reactivos.

- mezcla de solución reguladora coenzima (glicina pH 9.0 0.1M y NADH 0.0013M)
- ATP 2×10^{-2} M
- fosfoenolpiruvato 2×10^{-3} M
- sulfato de magnesio 2×10^{-2} M
- lactato deshidrogenasa

Método.

En una cubeta de 3.5 ml se coloca 1 ml de suero, 0.7 ml de mezcla solución reguladora coenzima, 0.05 ml de suspensión LDH, mez-

clar y dejar reposar por 5 minutos o hasta obtener la temperatura de 30°C. Adicionar 1.75 ml de creatina en solución reguladora. Ajustar el densitómetro a cero con solución reguladora de glicina pH 9.0 0.1M. Leer las muestras a 340 nm durante 10 minutos cada 2 minutos. El $\Delta E/10$ minutos no debe ser mayor de 0.300/10 minutos de no ser así, diluir el suero con solución salina isotónica.

RESULTADOS.

Toxicidad aguda.

Se presentaron síntomas de toxicidad como:

- a) Hipoactividad, pelo erizado, hemorragia nasal, taquicardia, disnea y diarrea.
- b) La muerte ocurrió por paro respiratorio entre 24 y 48 hrs después de administrado el fármaco (AYAP).
- c) En la necropsia realizada no se observó lesiones a nivel macroscópico en órganos como: riñón, corazón, hígado y pulmón, ni en la zona de aplicación.
- d) Los rangos de dosis letal media obtenidos son los siguientes:

Para rata Wistar:

vía intramuscular: 45.12 \geq 42.14 \geq 39.55

vía intraperitoneal: 38.97 \geq 38.85 \geq 39.82

Para ratón Balb/c:

vía intraperitoneal: 78.42 \geq 73.44 \geq 67.86

Toxicidad subaguda.

- a) Esta prueba se realizó en rata macho Wistar, vía intramuscular.

Los rangos establecidos en este estudio se basó en los obtenidos de la DL_{50} , siendo de 4, 8, 12, 16 y 20 mg/kg de peso.

- b) En los primeros 15 días de iniciado la administración del fármaco se observó pelo erizado e hipoactividad en todas las dosis, siendo más marcados estos síntomas en las dosis de 16 y 20 mg/kg de peso.

A los 30 días de administración del fármaco se observó ligero sangrado de nariz en dosis de 16 y 20 mg/kg de peso.

En un período de 3 meses se presentó pérdida de pelo en dosis de 16 y 20 mg/kg de peso, pequeñas cicatrices bajo la quijada, se presenta disnea y ligero aumento en la hipoactividad.

A los 4 y 5 meses se empiezan a manifestar estos síntomas en las dosis de 4, 8 y 12 mg/kg. Se presenta en este período 2 muertes en las dosis de 16 y 20 mg/kg respectivamente. Realizando necropsia, sin encontrar daños o alteraciones en los diversos órganos observados en forma macroscópica. A los 6 meses de administrado el fármaco se observa sangrado general de nariz, alopecia ligera, hipoactividad, disnea, taquicardia y diarrea, siendo más marcados estos síntomas en las dosis de 18, 16 y 20 mg/kg.

c) Se muestreó vía lacrimal al término del tiempo establecido (6 meses), a las 24 hrs y 7 días después de la última administración de fármaco. Realizando las pruebas de proteínas totales, electroforesis actividad enzimática de TGO, TGP y CPK, y conteo celular, así como el estudio histopatológico.

A dosis de 12 y 17 mg/kg la velocidad de coagulación aumentó en forma sumamente apreciable durante el muestreo teniendo que la cantidad de muestra fue pequeña y difícil de obtener. En dosis de 20 mg/kg este efecto disminuía ligeramente.

DETERMINACIONES CLÍNICAS.

Proteínas séricas totales: Se encontró disminución en las

concentraciones de proteínas al aumento de dosis, siendo más notable este efecto a los 7 días.

Fracciones proteínicas: Se encontró disminución considerable de albúmina, aumento en alfabroteínas a las 24 hrs después de administrado el fármaco y con un descenso a los 7 días. En alfabroteínas tipo II y betaproteínas se encontró elevadas su concentración en ambos casos, teniendo un efecto contrario a la dosis de 20 mg/kg de peso.

Enzimas séricas: La transaminasa glutámica oxalacética y la glutámico pirúvica presentan un aumento proporcional a las dosis administradas a las 24 hrs, a los 7 días se tiene un descenso en los niveles enzimáticos. La enzima creatin fosfo-cinasa se encuentra aumentada en dosis de 4 mg/kg únicamente teniendo un decremento en el resto de las dosis administradas, tanto a las 24 hrs como a los 7 días.

Conteo celular: No se encontró variación en el conteo celular con relación al blanco.

Estudio histopatológico: No se encontró alteración aparente macroscópicamente en corazón, riñón, bazo y testículo. Mostrando una ligera vasoconstricción en hígado. Se eligió para el estudio de cortes histopatológicos exclusivamente al hígado y al testículo.

Se tomaron microfotografías fotónicas de campo claro con técnica de tinción hematoxilina-eosina en hígado y testículo fijado en formol. Teniendo los resultados siguientes:

Hígado.

Testigo: a 160X se observan 16% de células binucleadas, heterogeneidades en el tamaño de los núcleos y un número de nueve núcleos grandes en 10 campos con objetivo 40X. El citoplasma se encuentra normal.

Dosis 4 mg/kg; en las mismas condiciones que el testigo se observó 19% de células binucleadas heterogeneidad en el tamaño de los núcleos y una relación de 15 núcleos grandes en el campo de citoplasma normal.

Dosis 8 y 12 mg/kg, se tiene una disminución de células binucleadas 14%, 6 núcleos grandes en 10 campos relación disminuida de núcleos grandes en 10 campos.

Dosis 16 y 20 mg/kg; se tiene una disminución de células binucleadas 13 y 12% respectivamente se observa una gran proporción de células con citoplasma grande en relación con el testigo, se observa degeneración grasa aun mayor a 20 mg/kg.

Testículo.

Testigo: Se observó gran número de células intersticiales,

Dosis 4 mg/kg: hay un incremento en la mitosis, tanto en espermatoцитos secundarios como espermátides.

Dosis 10 y 12 mg/kg: Se observan túbulos seminíferos con menor grosor del epitelio estratificado aumento en el espacio espermatoгония-espermatoцитo y una neta disminución de células terminales (espermatozoides): Dosis 16 y 20 mg/kg: existe gran número espermatoцитos en relación a espermatozoides.

RESULTADOS

TOXICIDAD AGUDA DEL ACIDO 2-AMINO-5-YODOACETAMIDO PENTANOICO
EN RATON Balb/c, VIA INTRAPERITONEAL.

PRIMERA ETAPA.

No. animales	Dosis (mg/kg)	Rel. muertos/tratados	Mortalidad
2	1	0/2	0
2	2	0/2	0
2	4	0/2	0
2	8	0/2	0
2	16	0/2	0
2	32	0/2	0
2	64	0/2	0
2	128	2/2	100

SEGUNDA ETAPA

4	70	0/4	0
4	80	3/4	75
4	90	4/4	100
4	100	4/4	100
4	110	4/4	100

No. animales	Dosis (mg/kg)	Rel. muertos/trataios	Mortalidad
10	50	1/10	10
10	66	3/10	30
10	72	5/10	50
10	78	5/10	50
10	84	9/10	90

TOXICIDAD AGUDA DEL ACIDO 2-AMINO-5-YODOACETAMIDO PENTANOICO
EN RATA WISTAR, VIA INTRAPERITONEAL.

De acuerdo a los resultados de las dosis administradas en
rata Wistar, vía intramuscular, se ensayaron directamente las
dosis de la segunda etapa, realizando por triplicado la tercera
etapa, en cada vía de administración y especie.

SEGUNDA ETAPA.

No. animales	Dosis (mg/kg)	Rel. muertos/tratados	% Mortalidad
4	34	0/4	0
4	38	2/4	50
4	43	4/4	100
4	46	4/4	100
4	50	4/4	100

TERCERA ETAPA

10	32	1/10	10
10	36	4/10	40
10	40	5/10	50
10	42	6/10	60
10	48	8/10	80

TOXICIDAD AGUDA DEL ACIDO 2-AMINO-5-YODOACETAMIDO PENTANOICO
EN RATA Wistar, VIA INTRAMUSCULAR.

PRIMERA ETAPA.

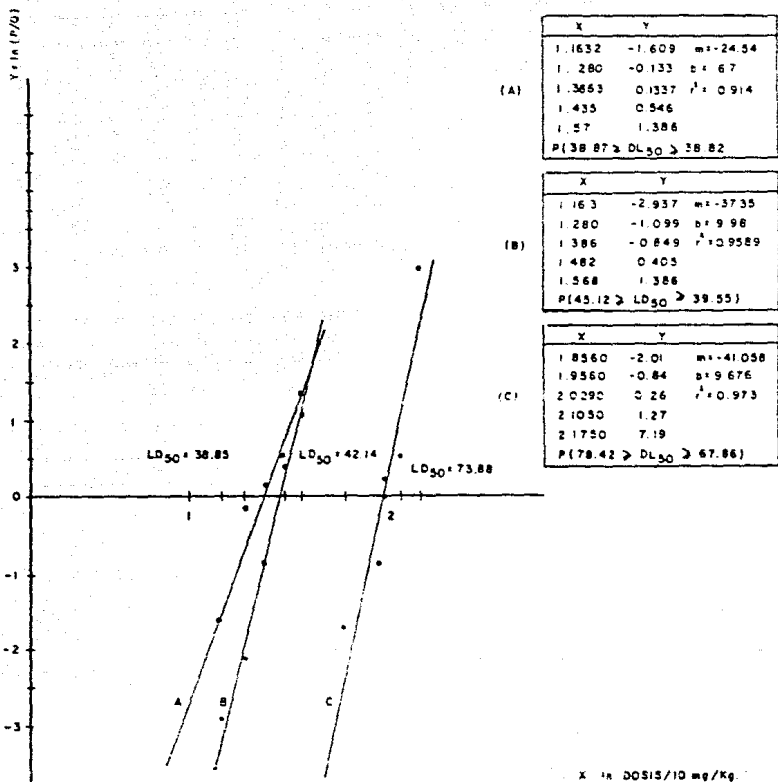
No. animales	Dosis (mg/kg)	Rel. muertos/tratados	% mortalidad
2	1	0/2	0
2	2	0/2	0
2	4	0/2	0
2	8	0/2	0
2	16	0/2	0
2	32	0/2	0
2	64	2/2	100
2	128	2/2	100

SEGUNDA ETAPA

4	34	0/4	0
4	38	1/4	25
4	42	2/4	50
4	46	4/4	100
4	50	4/4	100

TERCERA ETAPA

10	32	0/10	0
10	36	2/10	20
10	40	3/10	30
10	44	6/10	60
10	48	8/10	80

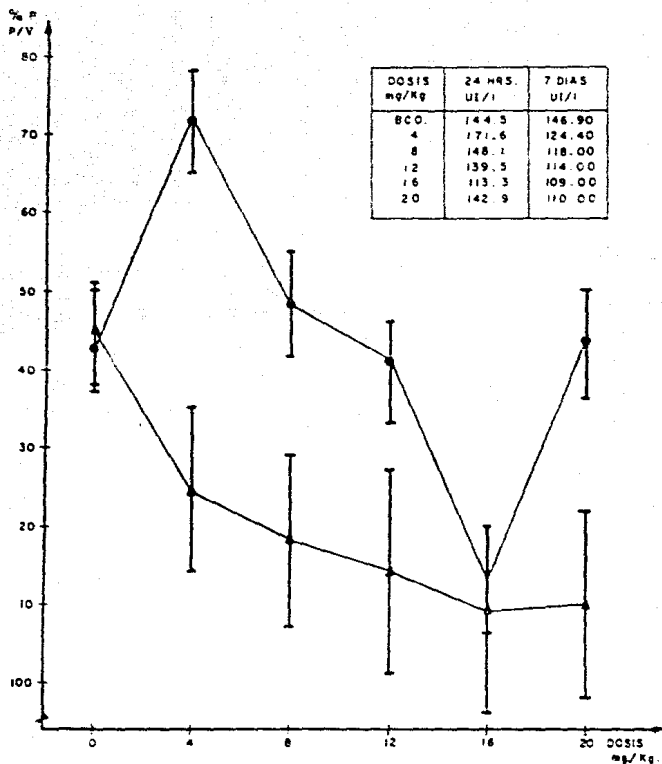


ESTIMACION DE LA LD_{50} DEL ACIDO 2-AMINO 5-YODOACETAMIDO PENTANOICO EN RATA WISTAR (A) VIA INTRAPERITONEAL, (B) INTRAMUSCULAR Y (C) EN RATON BALB/c VIA INTRAPERITONEAL, METODO DE LOGIT DE BERKSON, 1953).

SE GRAFICA $\log P/D$ Y \log DOSIS 10^{-1}

DOSIS EN RATA, VIA INTRAMUSCULAR E INTRAPERITONEAL: 32.36, 40.44, 48 mg/Kg.

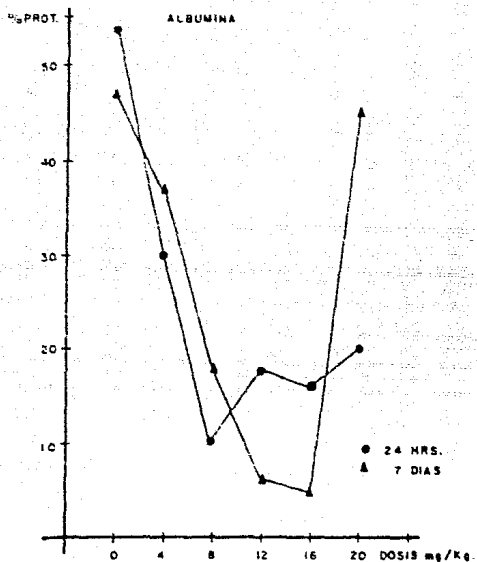
DOSIS EN RATON, VIA INTRAPERITONEAL: 60.66, 72, 78, 84 mg/kg.



DETERMINACION DE PROTEINAS SERICAS TOTALES (METODO LOWRY; 1951)
 EN RATA WISTAR SOMETIDOS A TOXICIDAD SUBAGUDA DURANTE 6 MESES CON 4, 8, 12, 16, 20 mg/Kg DE AYAP. EL FARMACO SE ADMINISTRÓ CADA TERCER DIA POR 45 DIAS Y UNA VEZ POR SEMANA DURANTE 125. LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE LOS GRUPOS, 24 (●) Y 7 DIAS (▲) DESPUES DE ADMINISTRADO EL FARMACO.

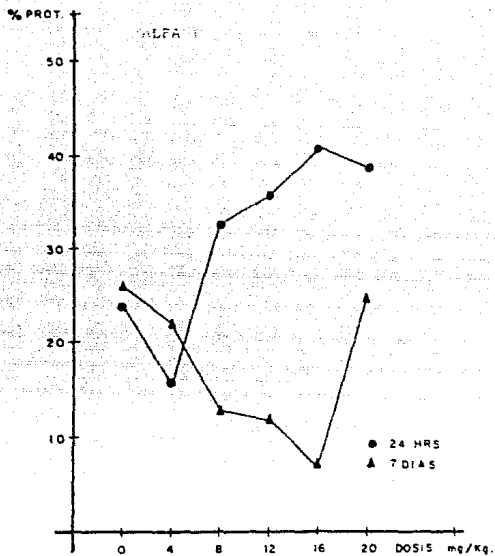
SE GRAFICA % DE PROTEINAS (% P) Y DOSIS mg/Kg.

(A)



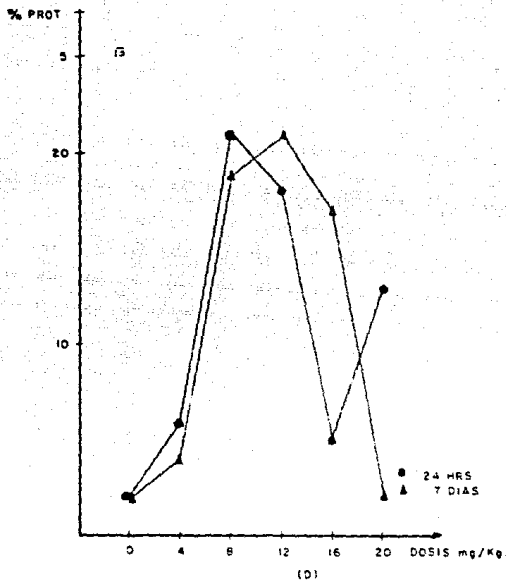
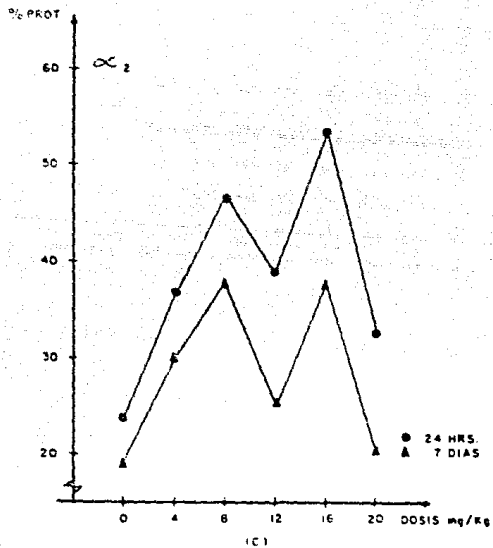
(A)

(B)



(B)

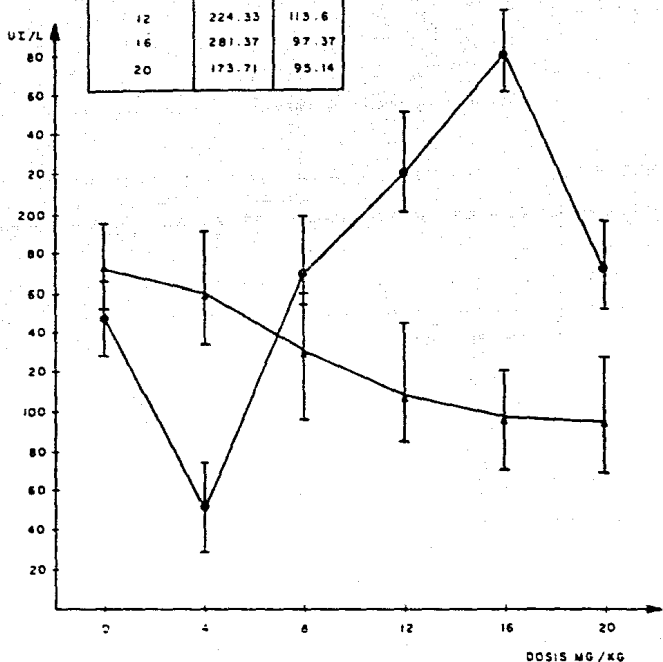
DETERMINACION ELECTROFORETICA DE FRACCIONES PROTEINICAS EN SUERO DE RATA WISTAR, VIA INTRAMUSCULAR SOMETIDOS A TOXICIDAD SUBAGUDA CON AYAP.



DETERMINACION ELECTROFRETICA DE FRACCIONES PROTEINICAS EN SUERO DE RATA WISTAR, VIA INTRAMUSCULAR
SOMETIDOS A TOXICIDAD SUBAGUDA CON AYAP.

(A) % ALBUMINA (B) ALFA I (C) ALFA II (D) B-GLOBULINAS

DOSIS (MG/KG)	24 HRS UI/L	7 DIAS UI/L
BLANCO	148.0	171.9
4	50.25	163.9
8	170.55	132.8
12	224.33	113.6
16	281.37	97.37
20	173.71	95.14

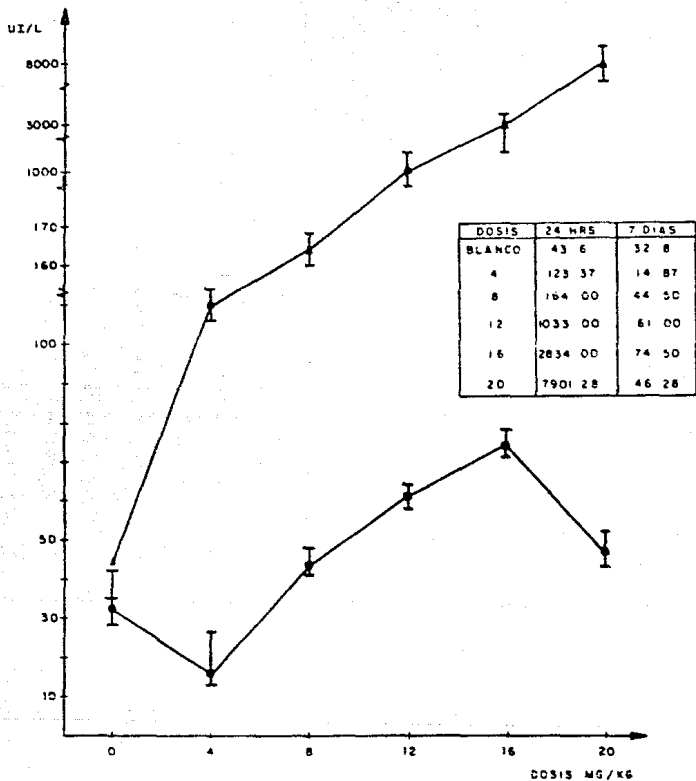


ACTIVIDAD DE TRANSAMINASA GLUTAMICO-OXALACETICO EN SUERO DE RATONES BALB/C (METODO DE KARMEN; 1955) SOMETIDOS A TOXICIDAD SUBAGUDA DURANTE 6 MESES CON 4, 8, 12, 16 Y 20 MG/KG DE AYAP.

LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE CADA GRUPO 24 HORAS (●) Y 7 DIAS (■) DESPUES DE ADMINISTRADO EL FARMACO

EL FARMACO SE ADMINISTRO CADA TERCER DIA POR 45 DIAS Y UNA VEZ POR SEMANA DURANTE 135 DIAS

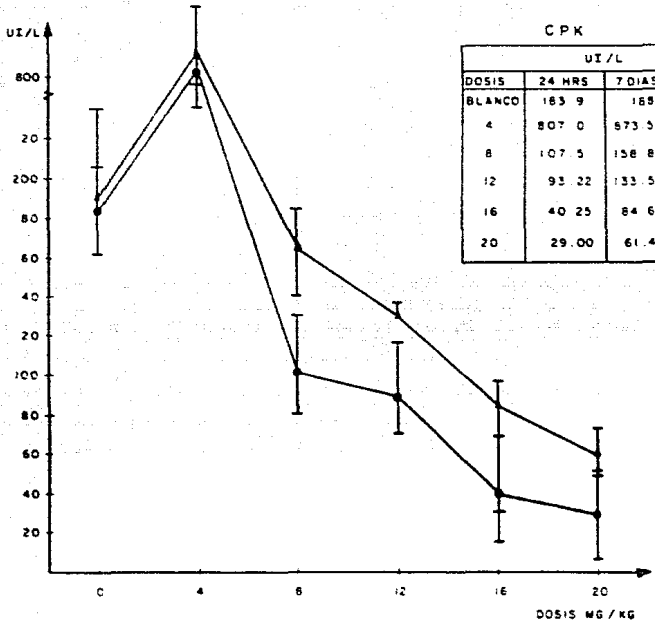
SE GRAFICA UI/L Y DOSIS MG/KG



ACTIVIDAD DE TRANSAMINASA GLUTAMICO-PIRUVICO EN SUERO DE RATA WISTAR (METODO DE KARMEN 1955) SOMETIDOS A TOXICIDAD SUBAGUDA DURANTE 6 MESES CON 4, 8, 12, 16 Y 20 MG/KG DE AYAP. LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE CADA GRUPO, 24 HORAS (▲); Y 7 DIAS (●) DESPUES DE ADMINISTRADO EL FARMACO.

EL FARMACO SE ADMINISTRÓ CADA TERCER DIA POR 45 DIAS Y UNA VEZ POR SEMANA DURANTE 135 DIAS.

SE GRAFICA UI/L Y DOSIS MG/KG



CPK		
UI/L		
DOSIS	24 HRS	7 DIAS
BLANCO	163.9	165
4	807.0	673.55
8	107.5	158.87
12	93.22	133.5
16	40.25	84.66
20	29.00	61.43

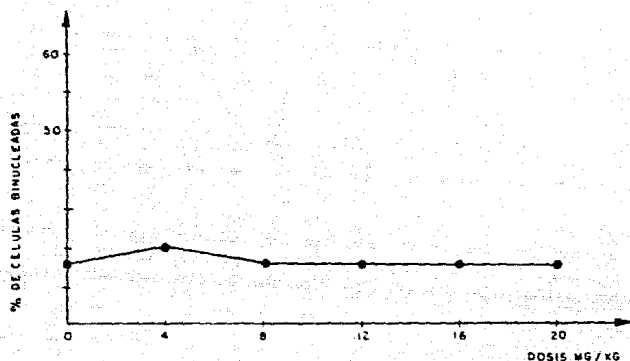
ACTIVIDAD DE FOSFOCREATINCINASA EN SUERO DE RATA WISTAR (MIDIENDO OXIDACION DE NADA A 340 NM) SOMETIDOS A TOXICIDAD SUBAGUDA DURANTE 6 MESES CON 4, 8, 12, 16 Y 20 MG/KG DE AYAP

LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE CADA GRUPO . 24 HORAS (●), Y 7 DIAS (▲) DESPUES DE ADMINISTRADO EL FARMACO

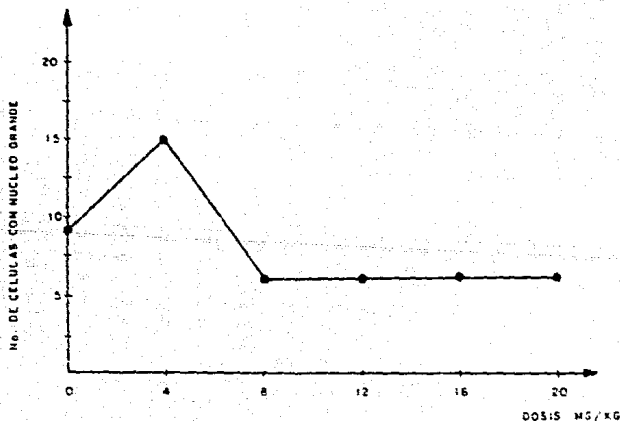
EL FARMACO SE ADMINISTRÓ CADA TERCER DIA POR 45 DIAS Y UNA VEZ POR SEMANA DURANTE 135 DIAS

SE GRAFICA UI/L Y DOSIS MG/KG

Fig. 1



RELACION DE CELULAS BINUCLEADAS EN RATA MADRO NISTAR SOMETIDOS A
EXPOSICION SUBAGUDA DURANTE 6 MESES CON DOSIS DE 4, 8, 12, 16 y
20 mg/kg DE PESO. FARMACO: 2-AMINO-5-YORKOCETAMIDO PENTANOICO.



RELACION DE CELULAS CON NUCLEO GRANDE EN RATA MADRO NISTAR SOMETI-
DOS A EXPOSICION SUBAGUDA DURANTE 6 MESES CON DOSIS DE 4, 8, 12, 16 y 20 mg/kg

CONCLUSIONES.

1. El gran paralelismo existente entre las rectas de DL_{50} en rata Wistar y ratón Bal b/c indican que en ambas especies presentan un mismo mecanismo de acción.
2. Las pendientes de DL_{50} tan pronunciadas indican que la población responde más uniformemente al fármaco, teniendo una menor variación en los datos siendo más precisa la estimación de la DL_{50} confirmándose esto con los pequeños intervalos de confianza obtenidos.

Rata Wistar:

vía intramuscular: 45.12 > 42.14 ≥ 39.55

vía intraperitoneal: 38.87 ≥ 38.85 ≥ 38.82

Ratón Bal b/c:

vía intraperitoneal: 78.97 > 73.44 > 67.86

3. La variación entre especies se ve confirmada con los valores obtenidos para la DL_{50} en rata Wistar y ratón Bal b/c, vía intraperitoneal.
4. La vía de administración es un parámetro importante en la velocidad de acción de un fármaco, encontrando valores ligeramente diferentes en una misma especie, rata Wistar, vías intramuscular e intraperitoneal.
5. Las manifestaciones de toxicidad aguda fueron: hipoactividad, sangrado de nariz, disnea y diarrea en ambas especies, tanto por vía intraperitoneal e intramuscular.
6. En toxicidad subaguda se presentaron los mismos síntomas de toxicidad aguda. Adicionándose: aumento en la velocidad

de coagulación, ligera alopecia siendo más pronunciada a dosis de 12, 16 y 20 mg/kg.

7. El fármaco presentó un efecto bifásico ya que a dosis bajas se encontró un porcentaje alto de proteínas y con dosis elevadas las disminuyó.
8. El ácido 2-amino-5-yodoacetanido pentanoico ha demostrado ser un fármaco con una gran actividad biológica, teniendo con ello ventajas tales como el poder tener una potencia superior a otros fármacos si la curva de dosis efectiva media (DE_{50}) presenta paralelismo a la DL_{50} . Sin embargo es muy estrecho el intervalo entre dosis efectiva y dosis tóxica, teniendo riesgos de toxicidad en aumentos de dosis.
9. El objetivo de la quimioterapia es desarrollar agentes que sean tóxicos selectivamente para células extrañas y que no perjudiquen al huésped, continuándose con estudios posteriores que nos darán mayor información sobre el mecanismo de acción del fármaco y el evitar efectos tóxicos, haciéndolo más seguro.

BIBLIOGRAFIA.

1. Abdel-Monem.MM.: -Methylornithine potent competitive inhibitor of ornithine descarboxylase. J.Med.Chem.; 18, 945-948. 1975
2. Acata Médica. Vol. XXI, Núm. 81 1985 págs. 35-53
3. Ariens F.J., P.A. Lehmann y A.M.Simons; Introducción a la toxicología general. Ed. Diana, México 1981.
4. Bachrach, U.,: "Funtion of naturally occurring Polyamines" Academic Press., N.Y., 1973
5. Baker, B.: "Non clasical antimetabolites. VII. The bridge principle of specificity with exoalkilating irreversible inhibitor" J.Med. Pharm. Chem. 5: 654, 1962
6. Baker, B.R.: "Chemical structure as related to antitumor action". Cáncer Inst. Monogr. 3: 9-33 (1960).
7. Bernhard, S.: "Estructura y función de las enzimas". Ediciones H.Blume. Madrid. 1977
8. Berkson J.: "Biological Assay" J.Amer. Statist. Assoc., 1953
9. Bliess, C.I.: "The calculation of the dosage mortality curves". Ann. Apl. Biol.: 22:134-137 and 307-333, 1939
10. Bondani G. A.: "La seguridad de un nuevo medicamento". Centro Mexicano de Desarrollo e Investigación Farmacéutica A.C., México 1982.
11. Bowman: Farmacología. Bases farmacológicas y patológicas aplicadas a la clínica. Ed.Interamericana, México, 1984

12. Campbell, R, Morris, D., Bartos, D., Daves y Bastos P.: "Advances in polyamine research". Vol. I. Raven Press, N.Y. 1978
13. Canellakis, : "The regulation and function of ornithine decarboxylase and of the polyamines". Curr Topics. Cell. Reg., 15: 155-220, 1979
14. Carvajal, G.: "Diseño, síntesis y estudio del efecto antitumoral de un inhibidor de la deshidrogenasa láctica". Tesis doctoral. ENCB-IPN. México, D.F. 1965
15. Dubin, D.T.: "The role of polyamines in the neutralization of desoxyribonucleic acid." J. Biol. Chem. 235: 769-775, 1960
16. Dubin, D.T.: "The assay and characterization of amines by means of 2,4-dinitrofluorobenzene". J. Biochem. 235: 788-786, 1960
17. Finney, D.J.: "Probit analysis". Cambridge University Press, Cambridge, U. 3a. Ed. 1952
18. Dudley, H. Rosenhaim, O y Starling, W.: "The constitution and synthesis of spermidine, a newly discovered base isolated from animal tissues". Biochem. J. 21: 97-103, 1927
19. Inoue, S.: Cell division and the mitotic spindle J. Cell. Biol. 91: 132-147. 1981
20. Iraola, J.: "Síntesis del ácido 2-amino-5-yodoacetamido hexanoico, probable inhibidor de la ornitina descarboxilasa" Tesis profesional. ENCB-IPN. México, 1985

21. Janne, J., Poso. H.: Polyamines in rapid growth and cancer" Bioch. Biophys. Acta. 473: 241-293, 1981
22. Joseph Barkson: A statistically precise and relatively simple method of estimating the bioassay with quantal response, based on the logistic function. American Statistical Association J., Sp. 565-591, 1953
23. Karmen, A.,: Quantitative estimation of glutamic oxalacetic transaminase activity in human serum. Clin. Res. Proc., I: 90, 1953
24. Karmen, A.: Transaminase activity in human blood, J. Clin. Inv. 34: 126-131, 1955
25. Lithfield, J.T. y Wilcoxon.: "A simplified method for evaluation dose-effect experiments". J. Pharmacol. Exp. Terap. U.S.A. (1949)
26. Loomis, T.A.: "Essentials of toxicology". Ed. 2a. Lea y Fabigr Filadelfia: 13-19, 145-176, 177-184, 1974
27. Lowry, O.H. y Rosebroug, N.J.: Protein measurement with folin reagent. J. Biol. Chem. U.S.A., 1951
28. Mamont, P.S.: "Enzyme-activate irreversible inhibitors", pp 43-54 Elsevier North-Holland Biomedical Press. 1978
29. Méndez, J.D.: "Inhibición del desarrollo embrionario de rata por administración intrauterina del ácido 2-amino-5-yodoacetamido valérico. XV Congreso Nacional de Bioquímica. Morelia, Mich., Méx. 1964
30. Mendoza E.R.: "Bioevaluación del ácido 2-amino-6-yodoacetamido hexanoico (AYAH), como inhibidor de la des-

carboxilasa de ornitina". Tesis de maestría, especialidad Farmacología. ESM-IPN. México, D.F.. 1987

- 31 Oriol-Audit, C.: "Polyamine-induced actin polymerization" EUB. J. Biochem., 87: 371-376, 1979
32. Oriol-Audit, C.: "Induction of cytokinesis by interaction between actin and polyamines". Biochem.62:713-714 1980