

5 300627
Dej



UNIVERSIDAD LA SALLE

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

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EFFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE LOS NIVELES DE GLUCOSA SANGUINEA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
GRACE BLANKENAGEL SEDANO

Director en Tesis:
M. EN C. JOSE DOMINGO MENDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA
EXPERIMENTAL DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA DEL
CENTRO MEDICO NACIONAL I.M.S.S. BAJO LA DIRECCION DEL M. EN C.
JOSE DOMINGO MENDEZ.**

I N D I C E

RESUMEN.

OBJETIVO.

INTRODUCCION.

GENERALIDADES.

- **DIABETES.**
 - . **FACTORES QUE LA PRODUCEN.**
 - . **SINTOMATOLOGIA.**
 - . **DETECCION.**
 - . **TRATAMIENTO.**
- **INSULINA.**
 - . **SINTESIS.**
 - . **EFFECTOS.**
 - . **MECANISMOS DE ACCION.**
 - . **DEGRADACION.**
- **POLIAMINAS**
 - . **ANTECEDENTES**
 - . **DISTRIBUCION.**
 - . **SINTESIS.**
 - . **INTERACCION CON OTROS CICLOS METABOLICOS.**
 - . **FUNCION CELULAR.**
 - . **POLIAMINAS Y MEMBRANAS.**
- **DIABETES EXPERIMENTAL; ALDXANA.**
- **POSIBLES INTERRELACIONES ENTRE LAS POLIAMINAS Y EL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS.**

MATERIAL Y METGDO.

RESULTADOS.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

PERSPECTIVAS.

REFERENCIAS.

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina sobre los niveles de glucosa sanguínea. Se analizan los posibles mecanismos de acción de las poliaminas que facilitan la oxidación de la glucosa. Se describe el posible mecanismo de acción de la insulina y se presentan evidencias experimentales que demuestran que tanto la putrescina como la espermidina, a diferencia de la espermina, favorecen el metabolismo de la glucosa regulando su concentración a niveles normales de manera similar a lo que ocurre con la insulina.

OBJETIVO

• ESTUDIAR EL EFECTO DE DIFERENTES
POLIAMINAS SOBRE LOS NIVELES DE
GLUCOSA SANGUINEA EN ANIMALES
CON DIABETES INDUCIDA •

I N T R O D U C C I O N

Las poliaminas son moléculas policatiónicas que se requieren para los procesos de división celular, diferenciación, crecimiento normal y patológico.

En la búsqueda de otras funciones específicas de las poliaminas, algunos investigadores han observado que estas moléculas de alguna forma se relacionan con el metabolismo de los carbohidratos, llegándose a pensar en un efecto similar al de la insulina.

Este efecto se había observado en sistemas "in vitro"; en este estudio se analizó el efecto de las poliaminas sobre los carbohidratos en sistemas "in vivo".

Por otra parte, el efecto de la insulina sobre el metabolismo de los carbohidratos ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, su mecanismo de acción no es bien conocido. A este respecto, existen varias teorías que serán presentadas y discutidas más adelante.

Considerando que la Diabetes es un padecimiento que se presenta por diferentes causas relacionadas con la insulina, consideramos conveniente describir algunas generalidades sobre este tópico.

GENERALIDADES.

- DIABETES.

La diabetes es una enfermedad crónica que afecta el metabolismo de los carbohidratos, de las grasas y de las proteínas. En general se puede decir que la diabetes se debe a la deficiencia en la acción o en la secreción de la insulina. La incidencia de esta enfermedad es muy alta, y en el año de 1977 fue la causa en sexto grado de mayor mortandad en los Estados Unidos (1). Existen varios factores que influyen en la incidencia de la Diabetes:

Factores Genéticos.- Se sabe desde hace tiempo que la Diabetes es en parte un desorden genético, sin embargo, es probable que la Diabetes sea genéticamente heterogénea.

Factores Ambientales.- Hay varios factores ambientales que aumentan la incidencia de la diabetes en aquellos pacientes que se encuentran genéticamente predispuestos.

1) **Obesidad.**- Es uno de los factores más importantes, aproximadamente un 80% de los pacientes diabéticos son obesos. Se ha visto que un 60% de las personas que son obesas tienen algún tipo de intolerancia de carbohidratos, la cual se ha demostrado por pruebas de tolerancia de glucosa (GGT). Frecuentemente al

perder peso los pacientes obesos corrigen la anomalía en cuanto a la intolerancia de los carbohidratos.

2) Embarazo.- Debido a este se ha visto un aumento al rechazo de la insulina o disminución en la efectividad de su acción. La probabilidad de adquirir diabetes se incrementa al aumentar el número de partos.

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS.

CLASE	TERMINOLOGIA COMÚN	FACTORES ASOCIADOS	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
DIABETES MELLITUS TIPO I	DIABETES JUVENIL	PRESENCIA DE PERFORACIONES DE AUTOINMUNIDAD FACTORES GENÉTICOS Y DE MEDIO AMBIENTE. ASOCIADOS CON ANTIGENIS.	ABSOLUTA AUSENCIA DE INSULINA. REQUIERE INYECCION DE INSULINA PARA PREVENIR COMPLICACIONES Y PRESEVAR LA VIDA. PUEDE APARECER A CUALQUIER EDAD, PERO ES MAS COMUN EN LA JUVENTUD.
DIABETES MELLITUS TIPO II 1.- OBESOS 2.- NO OBESOS	DIABETES MELLITUS ADULTO. DIABETES MELLITUS MADURA.	FACTORES GENÉTICOS Y DE MEDIO AMBIENTE. NO HAY ASOCIACION CON ANTIGENIS. OBESIDAD.	LOS NIVELES DE INSULINA PUEDEN SER NORMALES, ELEVADOS O BAJOS. SE PRESENTA EN LA MAYORIA DE LOS CASOS DESPUES DE LOS 40 AÑOS. EL 60-80% DE LOS PACIENTES SON OBESOS.
DIABES TIPOS INDISTINGUIBLES A LA DIABETES MELLITUS ASOCIADA CON CASOS IDENTIFICABLES	DIABETES MELLITUS SECUNDARIA.	ENFERMEDAD PANCREÁTICA (1), ENFERMEDADES HEPÁTICAS (2), INDUCIDA POR MEDICAMENTO (3), ANOMALIAS EN LA RECEPCION DE INSULINA (4).	DIABETES MELLITUS.

Padre No. 1.-Clasificación, Terminología y Características de la Diabetes (30).

.FACTORES QUE LA PRODUCEN.

1) **Insulino Dependiente (Tipo 1).**- Esta resulta de una severa falta de insulina. El bajo nivel de insulina en el plasma, se puede atribuir a una reducción en la masa de células beta del páncreas, que es característico de este tipo de diabetes. Se dice que la probable pérdida de las células beta es debida a: una infección viral, a una vulnerabilidad genética y a autoinmunidad. Las siguientes infecciones virales son las que se ha visto que aumentan los casos de diabetes insulino dependientes tipo 1: paperas, sarampión, rubéola y mononucleosis infecciosa (2).

El modo de acción es el siguiente: el virus causa una infección en el páncreas, entonces se libera una reacción de autoinmunización donde los antígenos liberados atacan a las células beta dañadas.

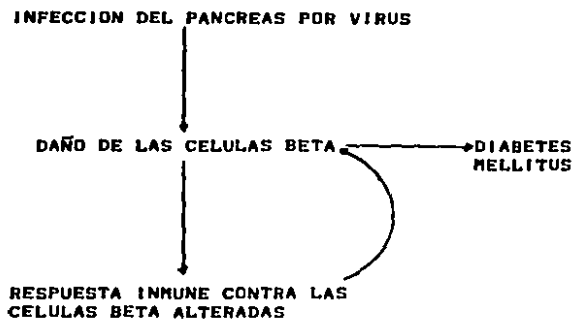


Fig.No.1.- Esquema simplificado para mostrar la interacción entre infección viral y autoinmunidad. (12)

2) No Insulino Dependiente (Tipo 2).- Este tipo no está caracterizado por una falta severa de insulina como en la Insulino Dependiente. Se han propuesto dos teorías para explicar la intolerancia a carbohidratos en este padecimiento:

a) Hay un desarreglo primario en la secreción de insulina que hace que sea más lenta o insuficiente en relación a la cantidad de insulina en el cuerpo.

b) Hay una anomalía que consiste en que los tejidos periféricos no responden al estímulo de la insulina. Se ha sugerido que la causa de esta anomalía sea un defecto en el receptor de glucosa de las células.

Tanto en los pacientes obesos como durante el embarazo, la sensibilidad de los tejidos hacia la insulina decrece, pero el páncreas compensa esta situación al producir un exceso de insulina. Por tanto, si hubiera un defecto en la producción de insulina, la obesidad la enmascara y precipita la diabetes.

SINTOMATOLOGIA.

En las personas que presentan diabetes, el nivel de glucosa sanguínea es anormalmente elevado (hiperglucemia), se excreta una gran cantidad de glucosa en la orina (glucosuria), además la excreción de orina es en grandes cantidades o volúmenes. También se presenta un aumento en la sed debido a la pérdida de agua, hay un aumento en el apetito, pérdida de peso muy notoria y debilidad muscular. Los diabéticos también son muy susceptibles a infecciones de la piel, tuberculosis, neumonía, etc.

Las personas que tienen diabetes tipo I presentan: poliuria, polidipsia (sed intensa), polifagia (aumento de apetito), pérdida de peso y debilidad. Bioquímicamente presentan aumento en la concentración de glucosa en sangre y concentraciones elevadas de glucosa en la orina. La cetoacidosis junto con coma puede presentarse en cualquier momento. Esta cetoacidosis se debe a la producción de cuerpos cetónicos, éstos se forman por una oxidación excesiva e incompleta de los ácidos grasos en el hígado, ejemplo de estos cuerpos cetónicos son el acetoacetato y el beta-hidroxibutirato. Además en los diabéticos el acetoacetato puede descarboxilarse dando como producto acetona (les proporciona un olor característico a los diabéticos).

En la orina de los diabéticos se encuentran altas concentraciones de urea, debido a una elevada oxidación de aminoácidos, que se acompaña de un incremento en la gluconeogénesis.

En casos graves de diabetes se presenta acidosis ocasionando un descenso del pH de la sangre. Esta acidosis proviene de la formación de cuerpos cetónicos, ya que cuando una molécula de ácido triglicérico se oxida se producen 12 H⁺ en forma de los ácidos acetoacético y beta-hidrosibutírico (3).

En la diabetes tipo 2 se tienen afecciones en los pequeños vasos capilares, arteriosclerosis, afecciones del riñón, de la visión y del sistema nervioso. A pesar de que estos pacientes también presentan anomalías metabólicas regularmente son más ligeras y controlables; casi nunca se presenta cetoacidosis.

.DETECCION

En las personas que presentan sintomatología como la anterior y también en aquellos que se cree que puedan tener diabetes se les aplica una prueba de tolerancia de glucosa (GGT).

Este ensayo se efectúa de la siguiente forma:

Después de una noche de ayuno, el paciente ingiere una dosis de ensayo de 100g de glucosa disueltos en un vaso con agua. Se mide la concentración de glucosa en sangre a intervalos de 30 min. después de la ingestión de solución de glucosa.

Una persona normal asimila la glucosa con facilidad, por tanto, el nivel de glucosa no aumenta mucho debido a que se induce una secreción normal de insulina por el páncreas, aumentando también la velocidad de consumo de glucosa por los tejidos. En la orina se presenta poca o ninguna cantidad de glucosa. En los pacientes diabéticos se ve una notable dificultad para asimilar la glucosa de la dosis de ensayo, por lo tanto el nivel de glucosa en sangre aumenta, provocando que aparezca glucosa en orina. Esto es consecuencia de que la secreción de insulina es inferior a la normal.

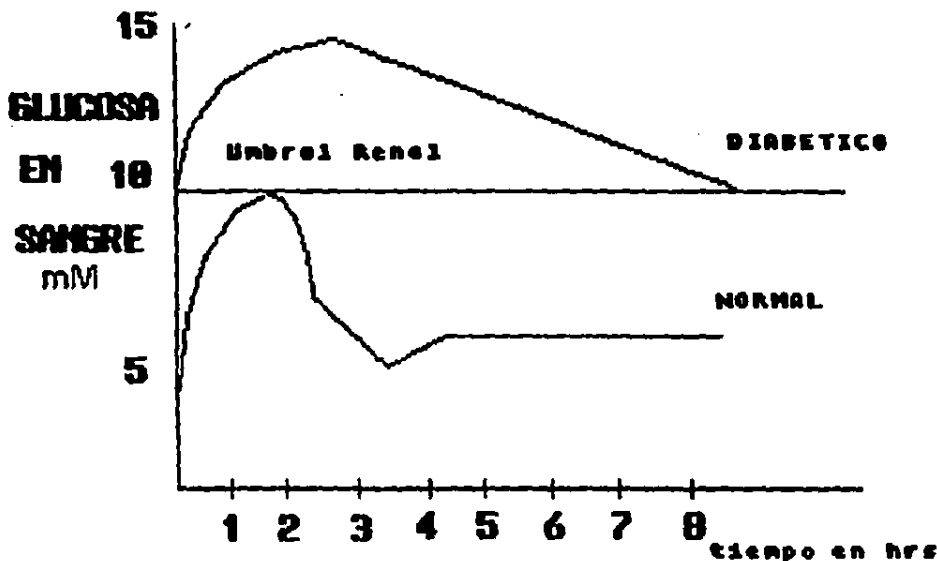


Fig.No.2.- Curvas de tolerancia a la glucosa de un sujeto normal y de un diabético. Después de la dosis de ensayo de glucosa, el nivel de glucosa en sangre puede elevarse dos veces de su nivel normal, pero disminuye rápidamente a medida que se estimula la secreción de insulina. En los diabéticos el nivel de glucosa ya es muy elevado, en este caso por encima del nivel de umbral del riñón. Después de la ingestión de la dosis de glucosa del ensayo, el nivel de glucosa de la sangre se eleva y permanece a un nivel elevado debido a la deficiente secreción de insulina. (1)

.TRATAMIENTO

El tratamiento de la diabetes se aplica de acuerdo a la naturaleza de la enfermedad y a la eficacia de los regímenes disponibles de tratamiento (dieta, hipoglucemiantes bucales e insulina).

DIETA.

Esta se da en forma individual para adaptarse a las necesidades de cada paciente.

Debe ser nutritiva y bien equilibrada teniendo como meta la reducción de peso en pacientes obesos mediante la disminución calórica.

Se recomienda la ingestión elevada de fibra, la sustitución de el azúcar refinado por edulcorantes artificiales como el sorbitol y aspartame. También se sugiere la práctica de ejercicio.

HIPOGLUCEMIANTES BUCALES. (Sulfonilureas).

Estas estimulan la producción de insulina en los islotes de Langerhans.

La administración de sulfonilurea en el diabético no obeso, restaura la fase inicial de liberación de insulina. Las sulfonilureas no se recomiendan para diabéticos insulino dependientes, ya que las sulfonilureas dependen de la función de las células beta para producir su efecto sobre el nivel de glucosa en sangre.

Tampoco se recomienda para diabéticos obesos y en los que presentan insensibilidad periférica a la insulina circulante.

Ejemplos de las sulfonilureas son: Tolbutamida, Cloropropamida, Acetohexamida, etc.(31)

INSULINA.- Está indicada para los diabéticos tipo I (DM1) y para diabéticos tipo II

La mayoría de las preparaciones de insulina contienen impurezas las cuales aumentan la inmunogenicidad de la insulina por lo que hasta ahora no ha sido muy satisfactorio el resultado del tratamiento por restitución de insulina.

Además de lo anterior, en la actualidad no es posible reproducir por completo el patrón fisiológico normal de la secreción de insulina hacia la vena porta.

Con las preparaciones de insulina porcina se redujo mucho la inmunogenicidad y ésta se podría eliminar al obtenerse por biosíntesis con DNA o mediante la conversión enzimática de la insulina porcina a la de la estructura humana. La insulina porcina sólo difiere en un aminoácido de la insulina humana.

Existen diferentes preparaciones comerciales de insulina que varían con respecto a la que se obtiene de la especie animal en la pureza y solubilidad, también difieren en el tiempo de inicio y duración de su efecto biológico (aprox. 40 formulaciones).

Los laboratorios Lilly han desarrollado una insulina humana preparada mediante el método de DNA recombinante.

La insulina se vende con concentración de 100 unidades/ml. (100u) en ampollita de 10 ml.

CONSIDERACIONES GENERALES DEL TRATAMIENTO.

Todos los pacientes diabéticos deben de recibir instrucciones adecuadas acerca de su higiene personal, especialmente en relación con la atención y cuidado de sus pies y dientes. Todas las infecciones, pero especialmente las piogénicas con fiebre, provocan la liberación de cifras elevadas de antagonistas de la insulina como catecolaminas y glucagon, provocando de esta forma un aumento en los requerimientos de insulina. Esta es una causa precipitada de cetosis y acidosis y debe ser tratada con rapidez.

Los factores psicológicos son muy importantes de controlar, particularmente cuando la enfermedad es difícil de estabilizar.

El asesoramiento debe dirigirse a evitar los extremos de rigidez compulsiva y la tolerancia de la negligencia completa autodestructiva.

Otras alternativas de tratamiento :

El trasplante de células de los islotes pancreáticos no ha sido exitoso debido al rechazo inamunitario, así mismo el trasplante de todo el páncreas no ha tenido éxito en el tratamiento de pacientes diabéticos dependientes de insulina.

Lo más común es la utilización de métodos nuevos perfeccionados para que el paciente averigüe su concentración de glucosa en el hogar, utilizando como remedio inyecciones de insulina subcutáneas. (5)

-INSULINA.

En los islotes de Langerhans en el páncreas se encuentran las células beta, las cuales producen insulina. En los casos de diabetes grave se ha visto que estas células tienen un aspecto hialino y no contienen gránulos secretorios.

La insulina es una proteína pequeña, de peso molecular de 5808 (insulina humana). Está formada por dos cadenas de aminoácidos unidas entre sí por puentes disulfuro (1). Si las cadenas se separan, la actividad de la insulina desaparece.

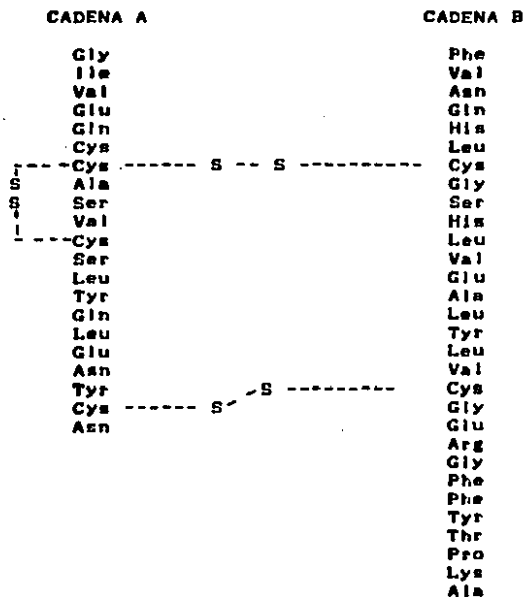


Fig.No.3.- Secuencia de aminoácidos de la insulina bovina (1).

.SINTESIS.

La insulina es sintetizada por las células beta en forma de un precursor inactivo, llamado proinsulina, la cual es una cadena polipeptídica con 75 a 86 restos de aminoácidos. En el momento en que llega un estímulo adecuado, la proinsulina se convierte a insulina por acción de peptidasas específicas que rompen dos enlaces péptidos en la cadena de la proinsulina, eliminando un segmento intermedio. Entonces se separan dos restos aminoácidos de los extremos del segmento intermedio y da como resultado el péptido C. Los dos segmentos terminales de la cadena original de la proinsulina se transforman en las cadenas A y B de la insulina. La propia proinsulina tiene un precursor anterior, preproinsulina que contiene 23 aminoácidos en el extremo terminal amino de la proinsulina. Esta secuencia se elimina por una peptidasa y se forma la proinsulina. Esta secuencia es señaladora ya que dirige a la proinsulina recién sintetizada a su destino específico dentro de la célula (1).

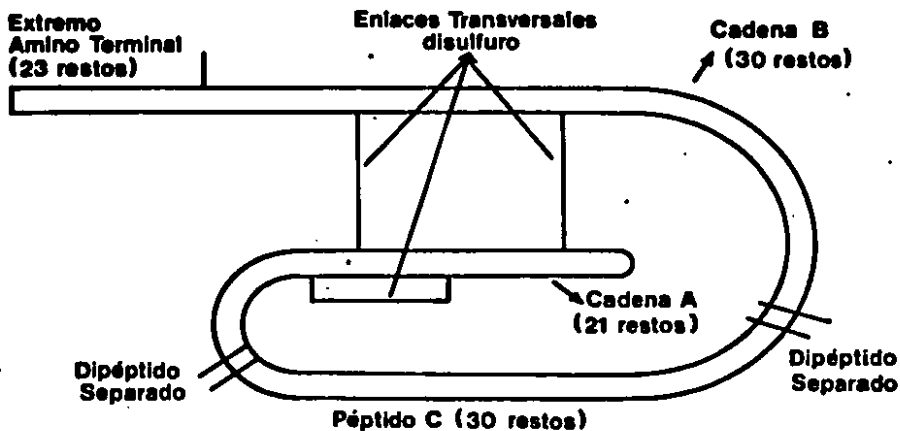


Fig. No.4.- Formación de la insulina a partir de sus precursores inactivos. La preproinsulina se convierte en proinsulina por eliminación de 23 aminoácidos del extremo amino terminal. La proinsulina se convierte en insulina al romperse los dos enlaces peptídicos. (1).

.EFECTOS.

La insulina tiene tres efectos dentro del metabolismo de los carbohidratos:

- 1) Aumento en el metabolismo de la glucosa.
- 2) Disminución de la concentración de glucosa en sangre.
- 3) Aumento de los depósitos de glucógeno.

En ausencia completa de insulina, el transporte de glucosa al interior de las células del cuerpo disminuye hasta una cuarta parte del valor normal.

.MECANISMOS DE ACCION.

La glucosa no puede entrar a la célula a través de poros, sino que tiene que hacerlo a través de algún mecanismo de transporte. En general, se dice que la glucosa se combina con un transportador de la membrana celular, luego pasa al interior de la membrana, de donde es liberada al citoplasma de la célula. Luego el transportador regresa a la superficie externa de la membrana para llevar otras moléculas de glucosa. El transporte de glucosa a través de la membrana celular no tiene lugar contra un gradiente de concentración. Cuando la concentración de glucosa dentro de la célula alcanza la concentración exterior, se detiene el transporte de glucosa (13).

En la membrana plasmática de las células que son sensibles a la insulina, se encuentran receptores para esta hormona. Estos receptores contienen elementos peptídicos que se encuentran en la superficie externa de la célula, y se cree que son los sitios en los cuales se forma un complejo con la insulina. Recientemente se ha aislado el receptor de la insulina y se ha purificado, observándose que se trata de una glucoproteína específica. La constante de disociación de la insulina con el receptor es de 5×10^{-9} mol. Esta glucoproteína tiene un PM aproximado de 300,000. (14).

Sólo se necesita que una pequeña fracción del número total

de receptores de insulina formen el complejo para que se genere una señal suficientemente fuerte para modificar la función celular. Se ha especulado que esta señal resulta de un cambio en cuanto a la forma del receptor.

Debido a la naturaleza del receptor surgen dos teorías :

1) Al efectuarse la unión entre el receptor y la insulina se genera un mediador intracelular X el cual afecta el sistema de transporte de la membrana y a las enzimas intracelulares originando los efectos típicos de la insulina. Ciertos nucleótidos cíclicos, el calcio, y otros iones hacen el papel del compuesto X.

2) Al formarse el complejo receptor-insulina se producen modificaciones en la estructura celular y como consecuencia se ven afectados los sistemas de transporte y las reacciones enzimáticas.

Sin embargo, ninguna de las dos teorías anteriores han sido apoyadas experimentalmente. (14)

Estas dos teorías se han ampliado a las siguientes:

A) Teoría que dice que la insulina puede modular directamente la actividad del AMP cíclico (4) :

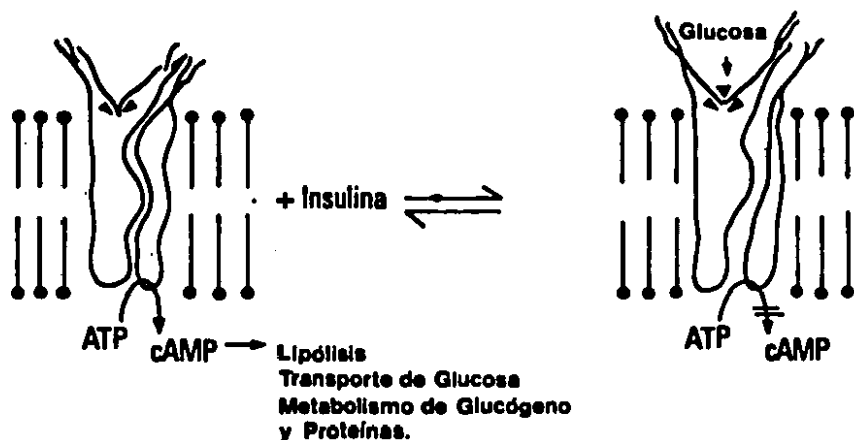


Fig.No.5.-Representación de la Teoría A (4).

B) En esta teoría se postula que la insulina da lugar a una sustancia X, la cual actúa como mediador y puede independientemente modificar varios procesos tales como la actividad de la adenilato ciclasa, transporte de glucosa, metabolismo de glucógeno. Sólo algunos de estos cambios se le pueden atribuir directamente a los cambios del metabolismo del AMP cíclico. Aunque esta teoría parece atractiva no hay evidencia de la existencia del mediador X. Este compuesto puede ser un constituyente integral endógeno de la membrana (4).

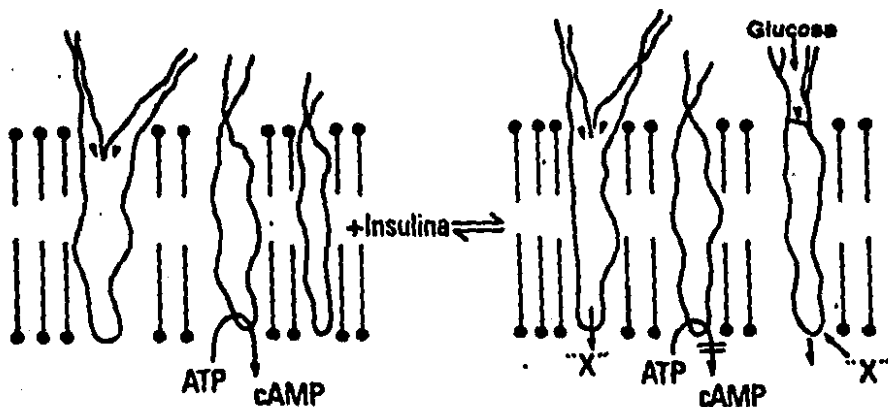


Fig.No.B.-Representación de la Teoría B (4).

C) Teoría en la cual la insulina causa un cambio de forma en la membrana, y este cambio a su vez puede simultáneamente alterar varios procesos, como los de transporte y actividad enzimática.

Se sabe que algunas hormonas peptídicas son capaces de producir cambios de forma en las membranas. Este tipo de cambios en la organización estructural de la membrana podría ocurrir debido a una agregación de los complejos receptor-insulina, o bien por agregación de otras proteínas de la membrana (4).

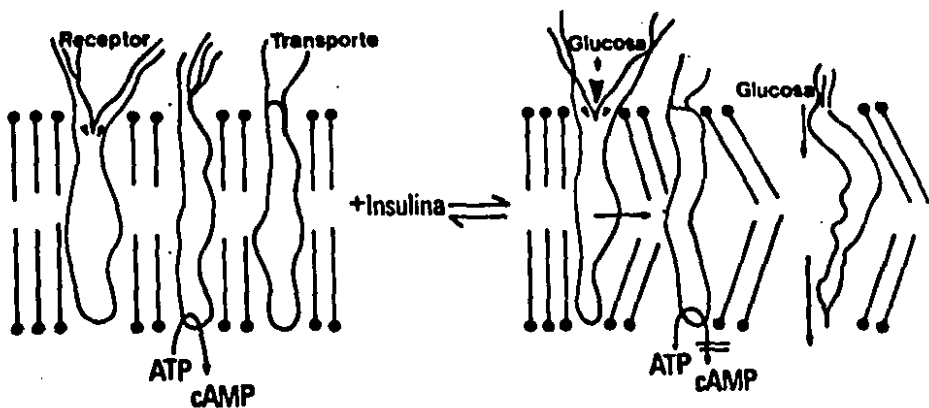


Fig.No.7.-Representación de la Teoría C (4).

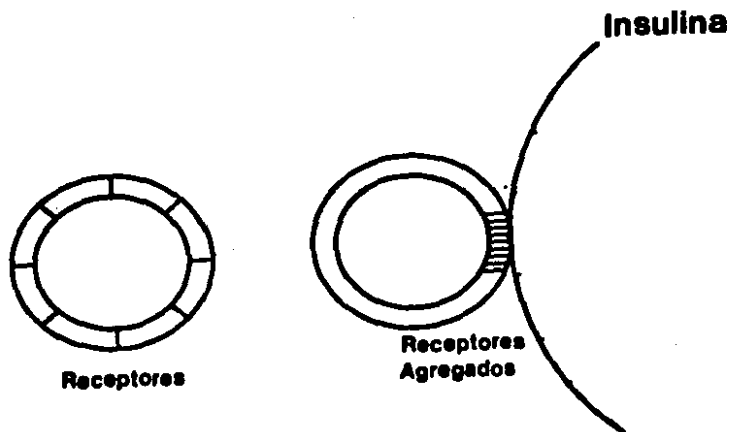


Fig. No. 8.- Agregación de los receptores de insulina por acción de la insulina. (4)

Al efectuarse el complejo receptor-insulina se generan algunas respuestas rápidas como el transporte de la glucosa, de aminoácidos y de iones orgánicos, y otras respuestas lentas como la aceleración del crecimiento, y la síntesis de proteínas específicas.

Una vez que la insulina ha actuado propiciando la introducción de la glucosa en la célula, está se pierde y no regresa al torrente sanguíneo. Un posible mecanismo para explicar esto es mediante un proceso de endocitosis, dando como resultado la penetración del receptor después de que ha sido ligado a la insulina. En este caso, el receptor actúa como transportador de la insulina.

La entrada del receptor de la insulina al citoplasma se ha demostrado con insulina marcada, y mediante métodos fluorescentes y autoradiográficos, los cuales revelan que al inicio la insulina se localiza en la membrana plasmática, luego se agrega en paquetes en la misma membrana y más tarde es introducida. Después los receptores junto con la insulina son ser metabolizados o procesados intracelularmente.

Los resultados experimentales son los siguientes :

- Cuando las células son expuestas a la insulina, la pérdida de receptores es rápida, aproximadamente 19% en 30 min. y es máxima a las 4 horas.
- Si se aumenta la concentración de insulina también aumenta linealmente la pérdida de receptores. Para medir la relación entre la endocitosis y la temperatura, se utiliza cloroquina, la cual inhibe la degradación interna de la insulina y también su procesa-

miento. De esta manera se mide la cantidad de insulina intracelular que se obtiene a diferentes temperaturas.

- Se ha observado que a 37 °C la insulina induce el 52% de la pérdida de los receptores (máxima), la pérdida disminuye progresivamente al disminuir la temperatura de incubación (10).

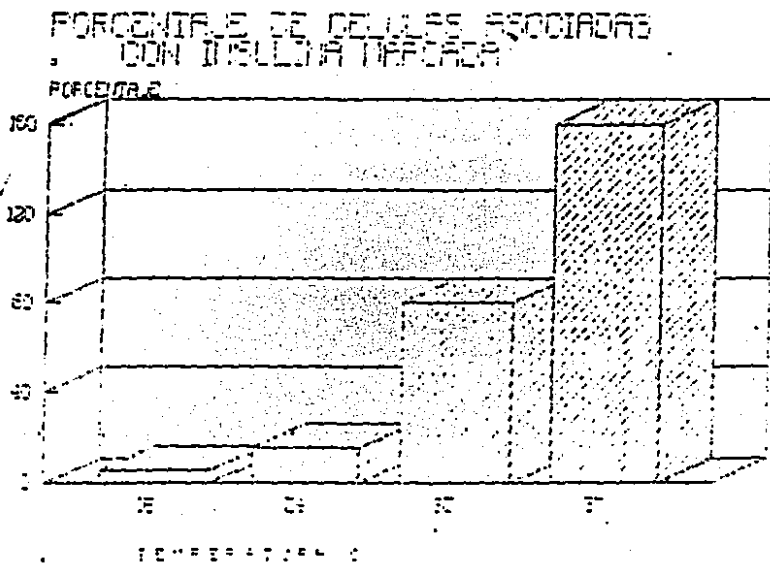


Fig. No. 9.- Representación del número de células asociadas con insulina en relación a la temperatura. (10)

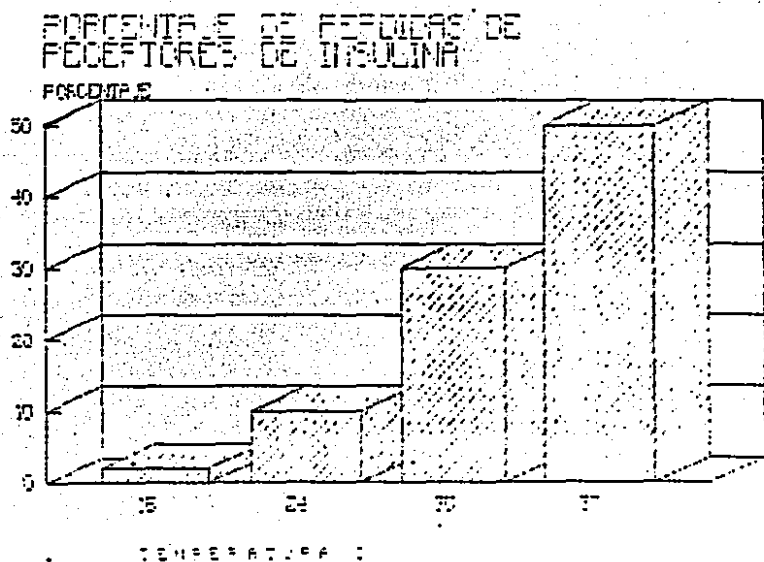


Fig. No. 10.- Relación entre la internalización de la insulina y la pérdida del complejo insulino-receptor en función de la temperatura. (10).

Más tarde, para comprobar la introducción de los receptores se hizo una gráfica de la pérdida de éstos en función de la introducción de la insulina (concentración de la insulina intracelular) dando como resultado una línea recta, cuya correlación es de 0.99.

EFECTOS DE LAS ACCIONES DE
 RECEPTORES DE INSULINA
 Y FUERZAS TRÁJIC
 FUERZAS

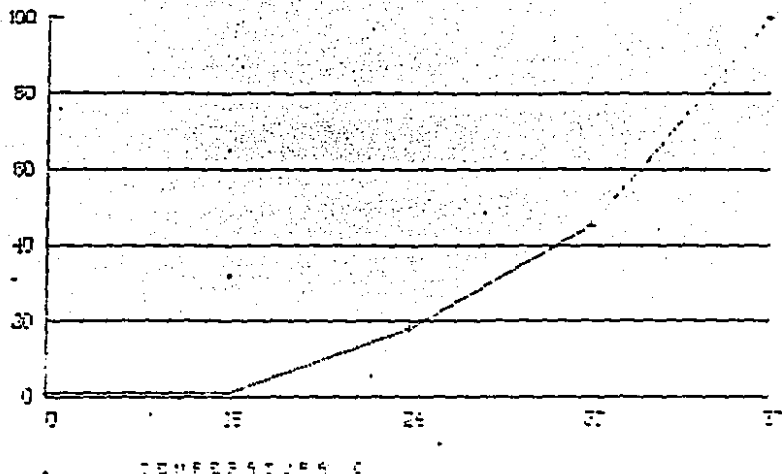


Fig. No. 11.- Representación lineal de la pérdida de receptores con el aumento de la temperatura. (10)

Después de la endocitosis, una porción de los receptores es procesada y metabolizada en un compartimento intracelular y la otra porción regresa a la superficie de la membrana plasmática.

La insulina intracelular es degradada eventualmente a productos de bajo PM, los cuales son liberados de la célula. Los pasos iniciales de la degradación de insulina consisten en la obtención de productos de PM intermedio entre la insulina y aminoácidos o péptidos pequeños. Estos intermediarios poseen actividad biológica reducida.

Se elaboraron tres hipótesis sobre el reemplazo de los receptores de la membrana, una vez que han entrado en la célula.

- 1) Se sintetizan nuevos receptores.
- 2) Los receptores se sintetizan de una fuente intracelular preexistente.
- 3) Los receptores que entran son reciclados.

La tercera hipótesis fue más acertada, ya que la fuente intracelular sólo podría dar el 10% de los receptores que se encuentran en la membrana plasmática, y para demostrar que no se logra una síntesis se incubaron adipocitos por dos horas a 37 °C en un medio asortiguado. Se indujo una pérdida de receptores por insulina, luego se eliminó toda insulina extracelular. Al ser tratado de nuevo con insulina se observó que no hubo disminución en la cantidad de insulina unida a los receptores, lo cual indica que no hubo síntesis de "novo". (10).

.DEGRADACION DE LA INSULINA.

A partir de las evidencias experimentales, se puede concluir que la degradación de la insulina se lleva a cabo dentro de las células en dos pasos:

1) Primero se rompen los enlaces disulfuro por acción de la enzima glutatióninsulina transhidrogenasa (GIT), dando las cadenas A y B.

2) Proteólisis de los polipéptidos resultantes dando compuestos de bajo PM.

Este proceso secuencial ocurre en altas y bajas concentraciones de insulina. En el hígado de ratas se encontró que la GIT se encuentra presente en los microsomas y también en una porción pequeña de la membrana plasmática cerca de los receptores de insulina.

La actividad de la GIT es regulada por la hormona del crecimiento y por el glucagon, por monotioles, ditioles, tiol-proteínas y algunos fosfolípidos.

La concentración de la GIT está controlada por la cantidad circulante de insulina. Se ha visto que la GIT también degrada glucagon, globina y proinsulina, por lo que no es específico de insulina.

- P O L I A M I N A S

. ANTECEDENTES.

Antonio Van Leeuwenhoek en 1678, se encontraba estudiando el semen humano y notó que cuando se dejaba reposar por unos minutos se formaban unos cuerpos tan pequeños como el grano de arena más fino. Estos cuerpos los describió como muy brillantes y claros, como si fueran cristales. A él se le acredita el descubrimiento de los espermatozoides así como el de la sal de fosfato de una poliamina, la espermina. (15).

Nicolas Vauquelin en 1791 cuando se encontraba haciendo experimentos para la liquefacción del semen, reportó la formación de cristales que eran insolubles en agua y etanol. De esto concluyó que los cristales estaban formados de fosfato de calcio. (16).

No fue sino hasta casi un siglo después en 1865 que Boettcher consideró que estos cristales estaban formados por proteínas, que llamó espermatina. El descubrimiento de que se trataba de una sal de fosfato de un compuesto orgánico básico simple, se le atribuye a P. Schreiner en 1878. Como resultado de un análisis poco exacto Schreiner le asignó la fórmula empírica de C_2H_5N por lo que se le confundió con compuestos cíclicos como la etilnamina (C_2H_4NH) o la piperazina ($(C_2H_4NH)_2$).

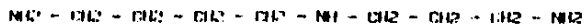
El nombre de espermina se le dió a esta base orgánica en el año de 1888 por Ladenburg y J. Abel debido a que se encontraba en altas concentraciones en el semen humano, a pesar de que ya se había descubierto su presencia en otros tejidos humanos.

En 1899 Poehl dijo que las inyecciones de espermina curaban un gran número de enfermedades sin relación alguna, como la artritis y el tifus (enfermedad viral que da escalofríos, fiebre, estupor y aparición de pequeñas manchas). Poehl no tuvo mucha aceptación a su tratamiento propuesto. Fue hasta 1926 que se descubrió la fórmula y estructura química de la espermina y de la putrescina.

F O R M U L A S .



P u l v e r i n a .



E s p e r m i d i n a .



E s p e r m i n a .

. DISTRIBUCION.

Las poliaminas se encuentran ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos, pero se ha visto que sus concentraciones varían según el tipo de célula.

La putrescina y espermidina están presentes en todas las células eucariotes y procariotes. En general, los procariotes tienen mayor concentración de putrescina que de espermidina, y carecen de espermina (a pesar de que puede ser utilizada por los procariotes, la espermina sólo puede ser sintetizada por los eucariotes) . (16) .

Sin embargo, se ha visto que muy pocos organismos son incapaces de sintetizar putrescina, estos organismos crecen muy lento o no crecen en ausencia de putrescina.

En todos los casos, el requerimiento de putrescina se puede reemplazar por la espermidina, la cual restaura el crecimiento.

La espermina en las células eucariotes está presente junto con una enzima, la espermina oxidasa, la cual es capaz de convertir a la espermina en un antibiótico muy potente, el dialdehído. Se cree que la espermina pueda tener otra función en los fluidos extracelulares.

. SINTESIS

Las actividades de las poliaminas y de las enzimas que catalizan la síntesis de las poliaminas son elevadas cuando son tejidos de reproducción rápida y aumentan en concentración cuando el crecimiento o diferenciación es inducido. La estimulación de la síntesis de poliaminas aumenta la velocidad de síntesis de DNA RNA y proteínas. (18).

Síntesis de Putrescina.

La putrescina es el precursor de la espermina y espermidina. Esta se forma por descarboxilación de la ornitina mediante la enzima ornitina-descarboxilasa (ODC). Este es el paso limitante. Ver fig. No. 12.

La ornitina utilizada para estas reacciones proviene del plasma, pero también puede formarse dentro de las células por la acción de la arginasa. Se cree que la arginasa sea una de las enzimas que regulan la etapa inicial en la biosíntesis de poliaminas, además de que participa normalmente en el ciclo de la urea.

La ODC necesita para su actividad al fosfato de piridoxal. La actividad del fosfato de piridoxal se puede elevar con estímulos de hormonas, drogas, regeneración de tejidos y factores de crecimiento. (17).

Síntesis de Espermina y Espermidina. - La espermidina se produce a partir de la putrescina. A la putrescina se le adiciona un grupo propilamina que proviene de la metionina. La metionina primero es convertida en S-adenosilmetionina y luego se descarboxila enzimáticamente, por la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMD). El producto de la descarboxilación, S-adenosilhomocisteamina, es utilizado como donador de los grupos propilamina ($(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$) para la síntesis de espermidina y espermina.

La SAMD depende de putrescina para su máxima actividad, y a su vez es estimulada por los factores que activan a la ODC. Esta enzima es reprimida por espermidina y putrescina.

La incorporación de los grupos propilamina a putrescina para formar espermidina se lleva a cabo por la acción de la enzima espermidina sintetasa y la incorporación a la espermidina para la formación de espermina se lleva a cabo mediante la enzima espermina sintetasa. Ver fig. No. 12.

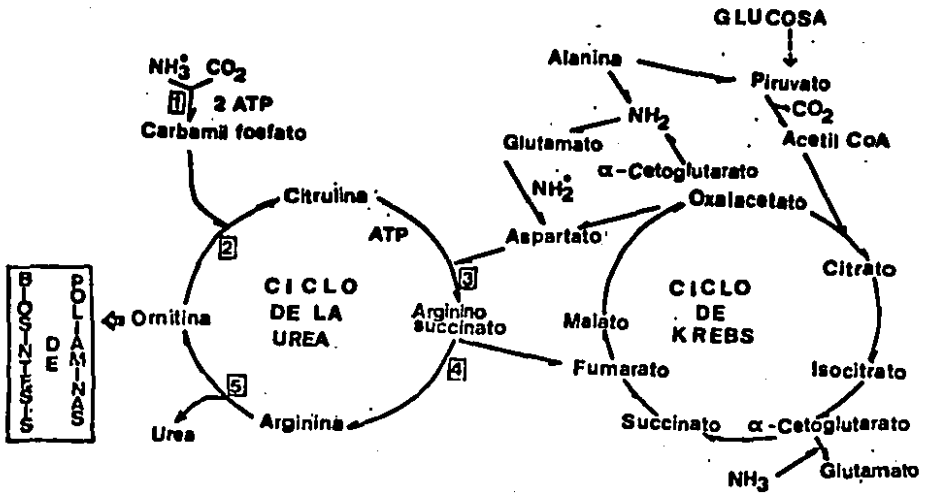


Fig. No. 13. Interacción de las Poliaminas con el Ciclo de Krebs

. INTERACCION CON OTROS CICLOS METABOLICOS

Ciclo de la Urea y Ciclo de Krebs.

El ciclo de la Urea consta de cinco pasos:

- 1) La conversión de bicarbonato y amonio en Carbamilfosfato por la enzima Carbamilfosfato sintetasa I.
- 2) Formación de Citrulina a partir de Ornitina y Carbamilfosfato por acción de la Ornitina transcarbamilasa.
- 3) Conversión de Citrulina y Aspartato en Argininosuccinato mediante la argininosuccinato sintetasa.
- 4) Hidrólisis de Argininosuccinato para formar Arginina mediante la Argininosuccinasa.
- 5) Degradación de Arginina para formar Urea y Ornitina mediante la Arginasa.

A partir de la Ornitina mediante la acción de la Ornitina - descarboxilasa se obtiene la putrescina y el resto de las poliaminas se obtienen a partir de ésta.

La síntesis de argininosuccinato es un paso importante en la interacción del ciclo de la urea con el del ácido cítrico.

La Alanina es transaminada para formar piruvato y su grupo amino es cedido por el alfa-cetoglutarato, pasando éste a glutamato.

El piruvato es descarboxilado y da Acetil CoA que se metaboliza en el ciclo de Krebs.

El glutamato por una reacción de transaminación con el oxalacetato forma aspartato y se regenera el alfa cetoglutarato.

El aspartato así formado contiene el segundo grupo amino destinado para la síntesis de urea.

El fumarato que se obtiene por hidrólisis de arginino-succinato, reacción catalizada por la argininosuccinasa regresa al ciclo de Krebs, y la arginina queda disponible para proseguir con el ciclo de la urea en el hígado. (17).

La arginasa efectúa la conversión de arginina en urea y ornitina y así el ciclo se completa. (Ver figura No. 13)

.FUNCION CELULAR.

La primera demostración de que los microorganismos requerían de las poliaminas fue hecho por Herbst y Snell en 1948 al observar que éstas eran necesarias para el crecimiento del Hemophilus parainfluenzae.

Silverman y Evans demostraron que la inhibición de Escherichia coli con quinina (un alcaloide) puede evitarse con espermina y esperidina. Debido a esto Snell sugirió que estos compuestos y muchos otros con propiedades bactericidas y contra protozoarios interfirieran en el papel que desempeña la esperidina en estos organismos. Se ha observado que la diamina sustituida, etambutol, la cual es muy importante para el tratamiento de la tuberculosis, inhibe el crecimiento de esta micobacteria in vitro y que esta inhibición es detenida mediante la adición de esperidina al medio.

Todas las especies del organismo Pasteurella tularensis crecen mejor en la presencia de esperidina o espermina.

Además Mager demostró que la lisis de Neisseria y Pasteurella así como la pérdida de material celular que ocurre en presencia de una fuerza iónica baja, es disminuida por la adición de esperidina. (16).

Poliaminas en Organismos Eucariotes.- existen pruebas de que la putrescina es esencial para el crecimiento de este tipo de organismos, ya que se requieren para la división de las células.

La proliferación celular incluye dos procesos: Crecimiento y división Celular.

El evento clave para el crecimiento celular es la duplicación del DNA. Los procesos de duplicación del DNA y mitosis se dividen en cuatro fases:

1) G1 es el periodo entre la mitosis y la síntesis de DNA. En esta etapa aumenta la concentración de poliaminas sintetizadas, que es cuando la célula se está preparando para replicación, además hay un aumento en la actividad de la ODC al final de G1 y comienzo de S.

2) S.- síntesis de DNA.

3) G2.- periodo entre S y M.

4) M.- mitosis.

La S'adenosil metionina descarboxilasa (SAMDC) sigue el mismo comportamiento que la ODC durante las cuatro fases . (18).

Se ha visto que las poliaminas debido a su carácter polifuncional, interactúan y estabilizan a los ácidos nucleicos. Esto se lleva a cabo por la formación de un enlace iónico entre los grupos amino de las poliaminas y los grupos

fosfato de los ácidos nucleicos, de esta forma se neutralizan las cargas y aumenta la estabilidad de estos ácidos nucleicos. (19). Se ha demostrado que las hormonas que son responsables del crecimiento o que son capaces de producir un efecto anabólico en un órgano, aumentan la síntesis de poliaminas. Generalmente estas hormonas actúan estimulando la actividad de la ODC, la cual es un paso clave para la síntesis de poliaminas.

Después de haberse efectuado una hepatectomía (Escisión parcial o total del hígado) la concentración de esperidina se incrementa fuertemente, ya que ésta acelera la síntesis de RNA, necesario para la regeneración hepática.

Raina y colaboradores observaron que la relación entre la cantidad de poliaminas y la cantidad de RNA permanecían casi constantes, por lo que dedujo que las poliaminas podían servir para estabilizar el RNA. (16).

Las poliaminas a bajas concentraciones estimulan la RNA polimerasa, y causan una transcripción selectiva de regiones específicas del DNA.

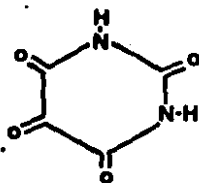
En las bacterias las poliaminas se encuentran asociadas principalmente con el RNA de transferencia, por lo que se deduce que tengan algún efecto sobre la síntesis de proteínas.

Poliaminas y las membranas:

Se ha demostrado que las poliaminas protegen a algunos organismos. Por ejemplo, Pasteurella tularensis la cual pierde viabilidad cuando se lava con agua destilada; sin embargo se protege con el uso de agua salina o agua que contenga espermina. Tanto la espermina como la esperaidina se ha visto que a una concentración de $10^{-3}M$ estabiliza a los protoplastos y a las membranas de S. faecalis contra la destrucción osmótica y la sonicación, aunque se ha visto que no se puede prevenir la fuga de componentes de pequeño peso molecular a través de la membrana celular.

Los resultados sugieren que la estabilización de los protoplastos está relacionada con el intercambio catiónico que se presenta la membrana celular con las poliaminas. (16).

- DIABETES EXPERIMENTAL: A L O X A N A.



La Aloxana tiene un Peso Molecular de 142.07. Fue descubierta por Liebig en el moco excretado durante la disenteria. Se puede presentar en forma de tetrahidrato, monohidrato y anhidro. En la forma de tetrahidrato forma prismas triclinicos largos o rombos monoclinicos a partir de agua. El monohidrato se produce por calentamiento del tetrahidrato a 100°C o por exposici3n al aire, y forma cristales triclinicos. La aloxana anhidra son cristales ortorr6mbicos y se forma utilizando acetona anhidra o 6cido ac3tico glacial, o por sublimaci3n en vacio. Se torna rosa a 230 °C. y se descompone a 256 °C.

Es soluble en agua, las soluciones acuosas con amabilias y llegan a ser incoloras cuando se enfrían. Las soluciones acuosas después de entrar en contacto con la piel humana por algún tiempo, dan un color rojo, y un olor desagradable. Así como la aloxana, muchos compuestos como el ácido úrico, el ácido dehidroascórbico, y las quinolonas destruyen selectivamente las células secretoras de insulina del páncreas. La Aloxana ha demostrado ser un medio conveniente de producir deficiencia insulínica en los animales de laboratorio. (20). Una sola inyección de una dosis alta de aloxana (200-400 mg/kg) administrada por vía subcutánea produce una diabetes severa y permanente en ratas al causarles necrosis de las células beta de los islotes de Langerhans. Una inyección intravenosa de 50-75 mg/kg produce una diabetes igual de severa que la anterior. (21, 22).

Otro compuesto que produce diabetes es la estreptozotocina. La estreptozotocina es un antibiótico derivado de Streptomyces chromogenes; éste causa una supresión altamente específica e irreversible de la actividad de las células beta del páncreas cuando se da una dosis de 50-100 mg/kg a las ratas. A las dosis de 65mg/kg hay una elevación inmediata de la glucosa plasmática, llegando a un máximo en 2 horas. Esto es seguido por hipoglucemia y en 24 horas se presenta hiperglucemia marcada y permanente. Este agente se ha usado para tratar los tumores de las células que producen insulina. Sin embargo, su utilidad está limitada por su gran toxicidad renal y hepática.

-POSIBLES INTERRELACIONES ENTRE LAS POLIAMINAS Y EL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS.

Lockwood observó que la espermina y la esperdmina tienen una acción similar a la de la insulina en el metabolismo tanto de la glucosa como de los lípidos.

A concentraciones de 0.001 a 0.1 μ M tanto de espermina como esperdmina suprimen la lipólisis y estimulan la conversión de glucosa a CO_2 . Ver Fig. No. 14

Respecto a la forma de acción de las poliaminas con el metabolismo de la glucosa existen varias teorías :

1).- Las poliaminas tienen función similar a la de la insulina por su semejanza en cuanto a la separación espacial de los grupos amino. De esta manera las diaminas separadas por 5 o 6 carbonos resultan poco efectivas en la acción tipo insulina, mientras que si tienen sus grupos separados por 7 o más átomos de carbono resultan tan potentes como la insulina.

De lo anterior se sugirió que las poliaminas actúan mediante el receptor de la insulina en la membrana plasmática.

Para comprobar esto, se hizo una digestión de adipositos con tripsina, la cual modifica al receptor de la insulina en la membrana y no se observó cambio alguno en la respuesta hacia la esperdmina, por lo que se concluyó que las poliaminas no actúan mediante el receptor de la insulina.

2).- Las poliaminas estimulan el transporte de glucosa mediante la formación de H_2O_2 . El H_2O_2 se ha demostrado que estimula el transporte de glucosa en células grasas. A este respecto se conoce que existe una dióxido oxidasa que utiliza putrescina como sustrato para la formación de H_2O_2 . Sin embargo Elgavish sostiene que esta teoría no explica la acción de las otras poliaminas, ya que la amina oxidasa no actúa sobre ellas.

3).- Las poliaminas al estar protonadas y tener carga positiva pueden funcionar sustituyendo algunos cationes en la membrana citoplasmática (Ca^{+2} o Mg^{+2}).

De la sustitución de estos iones se tienen los siguientes postulados :

a) El calcio estimula la formación de enlaces cruzados entre las proteínas de las membranas. Este estímulo se efectúa sobre las enzimas transglutaminasas generando una unión entre las proteínas mediante la formación de enlaces γ -glutamil- ϵ -lisina (25). Esta unión es entre el ácido glutámico de una proteína con el aminoácido lisina de otra proteína.

b) Las poliaminas se unen a lugares específicos de la membrana citoplasmática.

Debido a que otras diaminas no tienen efecto sobre las transglutaminasas, se propuso que la acción de las poliaminas no

es a través de la transglutaminasa, sino mediante la unión de las poliaminas con un lugar específico de la membrana.

Koenig propuso que la estimulación de la actividad de la ODC que genera acumulación de poliaminas está relacionada con el incremento del flujo de calcio, el cual aumenta la endocitosis, el transporte de hexosas, y el transporte de aminoácidos a través de la membrana celular. Este aumento en la concentración de calcio involucra una reacción de intercambio catiónico, de aquí se concluye que las poliaminas se unen a los sitios de la membrana celular, de la mitocondria y de otros organelos celulares con membrana que son aniónicos, desplazando el calcio unido a estos sitios y aumentando por lo tanto el calcio citoplasmático. (26)

La combinación de las teorías anteriores da como resultado el siguiente postulado:

Ocurre una reacción de intercambio catiónico como resultado de una interacción de espermina con las proteínas celulares. Esta reacción probablemente no dependa de la concentración de calcio, ya que no se requiere de calcio para que la unión espermina-proteína se realice, sin embargo, como resultado de esta interacción el calcio que se encontraba unido a las proteínas de la membrana se libera.

Esto puede resultar en un aumento de la concentración de calcio citoplasmático, el cual aumenta la actividad de enzimas dependientes de calcio; una de estas enzimas puede ser la transglutaminasa. Esta transglutaminasa forma una unión cruzada entre las proteínas de la membrana celular, lo cual modifica las propiedades de transporte de la membrana como son el transporte de hexosas, de aminoácidos y la endocitosis en general, esto está de acuerdo con la hipótesis de que las poliaminas controlan la permeabilidad de la membrana mediante la interacción de éstas con las proteínas de la membrana. (25, 27, 28).

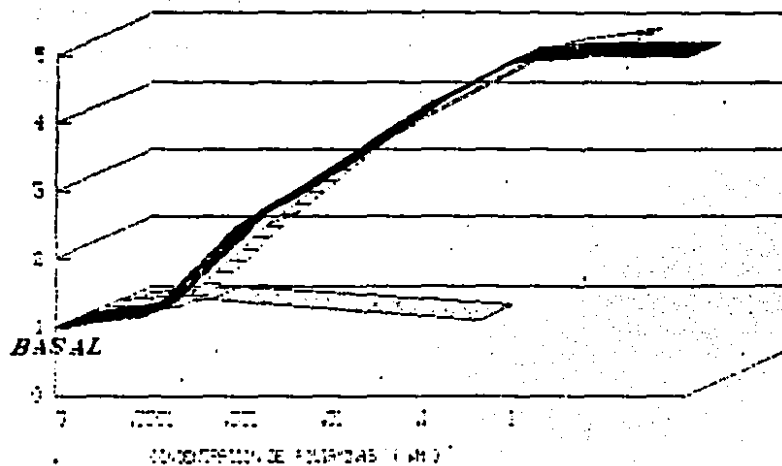
CONVERSION DE GLUCOSA A CO₂

Fig. No. 14 Relación del efecto de las poliaminas sobre el metabolismo u oxidación de la glucosa.

V.- MATERIAL Y METODO.

MATERIAL BIOLÓGICO:

Se emplearon 12 conejos de la raza Nueva Zelanda, todos machos de 3 a 6 meses de edad y con un peso entre 2 y 4 Kg., los cuales se mantuvieron en un bioterio bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Fueron alimentados "ad libitum".

MATERIAL QUÍMICO:

Se utilizaron equipos de Diagnóstico Merck para la determinación de glucosa en plasma, lípidos totales y colesterol.

Se utilizaron soluciones de las poliaminas espermina, espermidina y putrescina (Sigma), así como insulina inyectable.

Para la producción de diabetes en los conejos se utilizó 60 mg/Kg de aloxana en solución acuosa.

MÉTODOS:

- Procedimiento Experimental.

A los conejos se les tomó el peso corporal antes de comenzar el experimento, al inicio de la diabetes y durante el tratamiento.

Se hizo una primera determinación de glucosa, lípidos

totales y colesterol, que se utilizaron como referencia. Para esto la sangre de los conejos se obtuvo de las siguientes formas:

1) Extracción directa por punción al corazón. Este es un método rápido, por medio del cual la sangre no "sufrir" hemólisis, pero requiere de mucha experiencia. Si la punción no es realizada correctamente, el conejo puede morir.

2) Extracción de sangre por punción de las venas y arterias de las orejas. Para este método se utilizaron conejeras para inmovilizar a los conejos. Se frotó la oreja con alcohol para producir una pequeña irritación y turgencia en la vena.

La sangre extraída se dejó reposar, a temperatura ambiente o en Baño María a 35 °C., una vez formado el coágulo se desprendió de la pared del tubo, y se procedió a centrifugar los tubos a 3500 r.p.m. durante 10 min.

El suero que obtenido se utilizó para las diferentes determinaciones.

Para hacer las determinaciones se mantuvieron los conejos en ayuno durante 20 horas.

Para inducir diabetes, los conejos se mantuvieron en ayuno por 20 horas; después se les administró una dosis de 60 mg. de aloxana por Kg. de peso utilizando jeringas de insulina

(de 0.5ml) para aplicarse directamente en la vena localizada en el borde exterior de la oreja.

Después de dos días se realizaron las determinaciones de glucosa, lípidos totales y colesterol. Estos resultados se utilizaron como control del nivel de glucosa sanguínea en conejos diabéticos.

A partir de la toma de muestra anterior se inyectaron soluciones de poliaminas y de insulina diariamente vía subcutánea (las concentraciones se dan más adelante) en el cuello, inmediatamente atrás de las orejas, para evitar que el animal se rascara. Para este efecto se dividió el lote de conejos en cuatro grupos: A, B, C y D.

Al grupo A se le aplicó insulina en dosis de 0.2 U por Kg de peso. Se utilizó insulina comercial que contenía 80 U por ml.

Al grupo B se les administró espermidina en dosis de 100mg/Kg/día.

Al grupo C se les administró espermina en dosis de 100mg/Kg/día.

Finalmente al grupo D se les administró putrescina en dosis de 100mg/Kg/día.

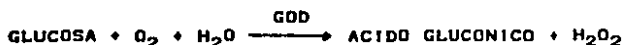
Cada cuatro días de tratamiento se hicieron determinaciones de glucosa, lípidos totales y colesterol.

Las técnicas para las determinaciones y los reactivos se describen a continuación:

G L U C O S A . (Método Glu-DH. Sistema 13886, 13887, 14051, del manual de Química de Clínica de Merk).

FUNDAMENTO:

La Glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa según la ecuación siguiente :



El peróxido de hidrógeno formado en esta reacción, reacciona en la presencia de peroxidasa (POD) con 4-aminantipirina y 2,4-diclorofenol. Por copulación oxidante se forma antipirilquinonimina roja. La cantidad de colorante formado es proporcional a la concentración de glucosa.

APARATOS:

Espectrofotómetro o fotómetro de filtros (510 nm)

REACTIVOS:

1) Reactivo de Coloración.

2) Solución Patrón

Adicionalmente se requiere de solución de ácido tricloroacético utilizado para desproteinizar. Ver tabla No. 5.

TABLA No. 5
DETERMINACION DE GLUCOSA

Pipetear en tubos de centrifuga.			
	Problema	Patrón	Bianco
Sol. de ac. tricloroacet.	1.00ml	1.00ml	-
Sangre o Suero	0.10ml	-	-
Sol. Patrón	-	0.10ml	-
Mezclar, centrifugar la muestra a analizar y pipetear en tubos de ensayo.			
Sobrenadante o patrón	0.10ml	0.10ml	-
Sol. de ac. Tricloroacet.	-	-	0.10ml
React. de Coloración	2.00ml	2.00ml	2.00ml
Mezclar, dejar en reposo 30 min. a temperatura entre 15 y 25 °C. Evitar la luz directa del sol. Medir las extinciones.			

C O L E S T E R O L. (Técnica de Liebermann-Burchard, Manual de Química Clínica de Merk. 3312 Merckotest).

FUNDAMENTO.

Con el anhídrido acético y el ácido sulfúrico concentrado, el colesterol forma compuestos de color intenso, a temperatura entre +15 a + 25 °C.

APARATOS :

Espectrofotómetro o fotómetro de filtros. Máximo de extinción: 610 nm.

Reactivos.

- 1.- Reactivo del colesterol (anhídrido acético 6.33 mol/L en ácido acético, 99 - 100%) 3 x 75 ml.
- 2.- Solución patrón de colesterol (300 mg/100 ml) 1 x 5 ml.

TABLA No. 6

DETERMINACION DE COLESTEROL

	MACRO		
	Problema	Patron	Bianco
Suero Solución Patrón 2	0.05 ml	--	--
Agua destilada	--	0.05ml	--
Reactivo del colesterol 1	2.0 ml	--	0.05 ml.
		2.0 ml	2.0 ml
Al cabo de 10 a 60 minutos pipetear en la pared de cada tubo directamente sobre la superficie del liquido			
Acido sulf. 95 - 97%	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.
Colocar los tubos de ensayo por separado inmediatamente despues de la adición del ácido sulfúrico en un baño de agua a temperatura entre + 15 a + 25 °C. y agitar. Sacar los tubos del baño de agua al cabo de 5 minutos como mínimo y desprender agitando las proteínas que puedan haberse adherido a la pared del tubo. Medir las extinciones de los problemas y del patrón contra el blanco 10 a 30 minutos despues de la adición del ácido sulfúrico.			

LIPIDOS TOTALES. (3321 Merckotest. Manual de Quimica Clínica de Merck).

Fundamento.

Se calienta el suero sin desproteinización previa con ácido sulfúrico concentrado y a continuación se trata con reactivo de ácido fosfórico-vainilla. En esta reacción los lípidos del suero producen un color rosado que se determina fotométricamente según N. ZOLLNER y K. KIRSCH. La concentración de lípidos totales en suero se obtiene comparando con las soluciones patrón.

Aparatos:

Espectrofotómetro fotómetro de filtros(530 nm) Baños de agua.

Reactivos

1.- Reactivos de coloración (Ácido fosfórico 11.9 mol/L, vainillina 8 mmol/L)

2.- Solución patrón de lípidos (corresp. a 1000 mg de lípidos/100 ml.)

Adicionalmente: Ácido sulfúrico 95 - 97%.

TABLA No. 7
DETERMINACION DE LIPIDOS TOTALES

Pipetear en tubos de ensayo.			
	Problema	Patrón	Blanco
Suero	0.05ml	-	-
Solución patrón 2	-	0.05ml	-
Acido sulfúrico 95_97%	2.00ml	2.00ml	-
<p>Mezclar, calentar los tubos cerrados durante 10 minutos, en agua hirviendo y dejar enfriar durante 10 minutos en agua fría. Pipetear de esta mezcla reactiva en un tubo de ensayo limpio:</p>			
Mezcla reactiva	0.10ml	0.10ml	-
Acido sulfúrico 95_97%	-	-	0.10ml
React. de Coloración	2.00ml	2.00ml	2.00ml
<p>Mezclar y medir al cabo de 40 a 50 min. las extinciones de los problemas y del patrón contra el blanco.</p>			

RESULTADOS.

Los resultados se presentan mediante tablas comparativas.

En la tabla No. 1 se registra la variación de peso de los conejos de los grupos A, B, C y D, a través del tiempo. El peso inicial se registró con fecha de 18/VI/87.

En la tabla No. 2 se muestran las variaciones de concentración de glucosa en sangre. El estándar de cada caso es el de la fecha 11/VI/87. En la fecha 17/VI/87 los conejos ya habían sido tratados con aloxana y se encontraban diabéticos. En las subsecuentes fechas estaban en su correspondiente tratamiento.

En la tabla No. 3 se muestra las variaciones de concentración de lípidos en el plasma sanguíneo a través del tiempo. El estándar como en el caso anterior es el día 11/VI/87, en estado diabético día 17/VI/87 y en tratamiento las siguientes fechas.

En la tabla No. 4 se muestra la variación de nivel de colesterol en plasma a través del tiempo. El control, estado diabético y tratamiento es igual a las 2 anteriores.

TITULO No. 1

PESO DE LOS ANIMALES ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO (g)

	No. de conejos	TRATADOS.		
		CONTROL	24-01-07	3-011-07
		10-01-07		
grupo II	1	4000	3975	3975
paltoresina	2	3540	3785	3780
	3	3710	3730	3725
grupo II	4	4100	**	**
espectro	5	3540	**	**
	6	3470	**	**
grupo II	7	3500	3365	3435
espectro	8	3540	3125	3165
	9	3660	3295	3215
grupo II	10	3805	**	**
espectro	11	3540	3115	**
	12	3540	3125	**

** Los conejos no sobrevivieron al tratamiento.

TABLA No. 2

CONCENTRACION DE GLUCOSA SANGUINEA (g/100ml).

	No. de conejo	11-01-87	17-01-87	22-01-87	26-01-87	3-01-87
grupo II patencia	1	84	131.7	96.4	106.3	100.1
	2	71	146.9	70.2	110.3	103.1
	3	61	116.4	80.2	79.2	96.4
grupo II esperanza	4	69	116.4	**	**	**
	5	92	127.9	**	**	**
	6	90	122.1	**	**	**
grupo II mediana	7	76	127.9	61.1	70.60	51.0
	8	71	143.1	36.3	**	**
	9	**	135.5	30.5	97.3	87.0
grupo II esperanza	10	**	**	**	**	**
	11	**	114.5	60.7	127.08	106.9
	12	**	**	**	**	**
Promedio		**	**	**	**	**

** Los conejos no sobrevivieron al tratamiento.

TIRLA No. 3

CONCENTRACION DE LIPIDOS
mg/100 ml.

	No. de conejo	11-VI-07	17-VI-07	22-VI-07	26-VI-07	3-VII-07
grupo A putrescina	1	100	262	06	180	180
	2	220	216	190	250	180
	3	200	100	360	324	100
grupo B espermina	4	260	396	**	**	**
	5	300	504	**	**	**
	6	290	**	**	**	**
grupo C insulina	7	260	504	90	280	20
	8	280	262	105	**	180
	9	**	262	214	260	340
grupo D espermidina	10	**	**	**	**	**
	11	**	**	262	360	260
	12	**	**	414	**	**
Promedio		233				

** Los conejos no sobrevivieron al tratamiento

TABLE No. 4

COLESTEROL
(mg/100 mL)

	Number concept	11-01-87	17-01-87	23-01-87	26-01-87	3-011-87
grupo II Falsosucina	1	111.4	106.9	89.3	89.4	101.1
	2	96.6	110.8	89.7	111.1	86.8
	3	89.1	148.6	74.0	140.5	74.2
grupo II Espervina	4	107.9	810.0	**	**	**
	5	89.1	891.0	**	**	**
	6	89.1	894.0	**	**	**
grupo II Tratamiento	7	96.6	74.2	111.1	74.2	89.7
	8	97.6	810.0	44.5	**	101.4
	9	**	448.5	101.4	96.6	89.1
grupo II Espervina	10	**	894.0	**	**	**
	11	**	**	89.4	81.64	110.8
	12	**	**	89.1	**	**

0 = control

96

** Data concept no administered at treatment.

VII.- Discusión y Conclusiones :

En lo que se refiere al peso de los conejos, hubo un descenso de aproximadamente 303.3 gramos en el grupo de putrescina. En dos de los conejos de este grupo se vio una recuperación del peso postratamiento.

En el grupo de conejos tratados con espermina no se lograron las comparaciones de peso, ya que poco tiempo después de iniciado el tratamiento murieron.

En el grupo de conejos tratados con insulina, hubo una disminución de peso menor en comparación con los otros grupos (-140g).

En el grupo de espermidina se vio un descenso en promedio de 420 gramos.

Los conejos del grupo tratado con putrescina junto con los del grupo de insulina, seguidos por los de espermidina fueron los que presentaron un mejor estado físico comparados con aquellos de espermina.

Concentración de Lípidos.

En general en todos los grupos se obtuvo un aumento de la concentración de lípidos en sangre después del tratamiento con

aloxana, este aumento fue bastante drástico y más tarde con el tratamiento de las poliaminas y la insulina los niveles de lípidos de todos los grupos descendieron por debajo del nivel normal.

Los niveles de lípidos en sangre disminuyeron en mayor grado en los conejos tratados con insulina que en los tratados con putrescina y espermidina.

Concentración de Colesterol:

En el grupo de los conejos tratados con putrescina, el nivel de colesterol no se elevó significativamente después del tratamiento con aloxana en comparación a los otros grupos.

En general también se observó un aumento de niveles de colesterol en sangre después del tratamiento con aloxana y un descenso a niveles casi normales con el tratamiento de las poliaminas y más notablemente con la insulina.

Concentración de Glucosa:

Los niveles de glucosa sanguínea mostraron un aumento muy notorio después del tratamiento con aloxana.

El grupo tratado con putrescina presentó un descenso a niveles normales, después de cinco días de tratamiento. Sin embargo después de nueve días, el nivel de glucosa ascendió otra vez a niveles por encima del normal, sin llegar a ser tan altos

como los registrados previos al tratamiento.

En el grupo de inulina el nivel de glucosa sanguínea durante el tratamiento, siempre permaneció a los niveles semejantes al original (74 g/100ml).

Los valores de glucosa en grupos tratados con putrescina y espermidina, fueron similares.

Los resultados experimentales indican que en los conejos con diabetes inducida con aloxana, tanto la putrescina como la espermidina producen una disminución en el nivel de glucosa sanguínea. Como la aloxana ataca específicamente a las células beta del páncreas, no hay fuente de insulina dentro del organismo, por lo que la disminución del nivel de glucosa en sangre se puede atribuir a la acción de las poliaminas.

Este resultado concuerda con las observaciones reportadas en sistemas *in vitro* relacionadas a la similitud entre la función de las poliaminas y la inulina.

En cuanto a la similitud de estructura, otros autores han hablado de que el efecto parecido de las poliaminas y la inulina se debe a la separación de los grupos amino por siete o más átomos de carbono. Si tomamos en cuenta la estructura de la inulina, vemos que los aminoácidos con grupos (NH₂) libres están

necesariamente separados por siete o más carbonos del siguiente grupo (NH₂) del aminoácido más cercano.

Por ejemplo, el par de aminoácidos con grupos (NH₂) más cercanos en la insulina es el de la cadena B:

Gln - His

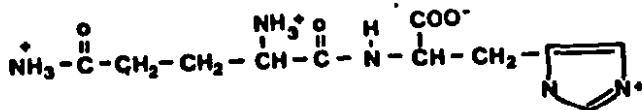


Fig. No. 15.- Representación de la separación de los grupos aminos libres en la molécula de insulina.

Con esta suposición cualquier diamina de cadena larga tendría el mismo efecto de la insulina y por tanto la insulina no es tan esencial para el metabolismo de la glucosa.

Se ha demostrado que las poliaminas no interactúan con el receptor de la insulina, por lo que esto nos confirma que las poliaminas no deben su efecto a una similitud con la estructura o composición con esta hormona.

Esto nos indica que las poliaminas tienen un mecanismo de acción diferente al de la insulina en el metabolismo de los carbohidratos.

La teoría que se considera más apropiada es la que propone que las poliaminas se unen a las proteínas de la membrana substituyendo al calcio, y que al aumentar la concentración de calcio se genera la acción de las transglutaminasas, las cuales mediante su formación de enlaces cruzados modifican el transporte de la membrana y permiten la entrada de la glucosa a la célula.

Con base en esta teoría se sugiere que una probable razón por la cual el efecto de las poliaminas sobre el metabolismo de los carbohidratos se reduce con el tiempo, es que se agote el calcio sustituible lo que puede constituir un factor limitante.

P E R S P E C T I V A S

El hecho de haber observado un efecto positivo de la putrescina y de la espermidina sobre la regulación de los niveles de glucosa en sangre, así como una mejoría física en los animales tratados con estas aminas, que se comparan con los efectos de la insulina, abre un panorama amplio de investigación con estas moléculas.

Se requiere investigar la utilización de dosis menores administradas por diferentes vías; así como el estudio de enzimas involucradas en la glucoólisis.

La regeneración de las células beta del páncreas inducida por poliaminas podría ser motivo de otra investigación posterior.

B I B L I O G R A F I A .

- 1) Robbins, A. : Basic Pathology. Third Edition. W.B. Saunders Company pp. 523-549. (1981).
- 2) Craighead, J.E. : Current views on the etiology of insulin-dependent diabetes mellitus. New England Jour. Med. 299:1439-1443, 1980.
- 3) Harper, H. : Manual de Química Fisiológica. Ed. El Manual Moderno, Sexta Edición México pp. 524-525. (1978)
- 4) Cuatrecasas, P. : Insulin receptor of liver and fat cell membranes. Fed. Proc. 32 (8): 1838-1845, 1973.
- 5) Tager, H. & Olefsky, A. : Structurally abnormal insulin causing human diabetes. Nature 281 (5727): 122-125, 1979.
- 6) Guyton, A. : Tratado de Fisiología Médica. Quinta Edición Interamericana pp. 1030-1045, 1977.
- 7) Kuo, J.F. & Dill, I.K. : Effects of deoxyfrenolicin on isolated adipose cells. Biochem. Pharmacol. 18: 749-756, 1969.
- 8) Kuo, J. F. : Stimulation of glucose utilization and inhibition of lipolysis by polyene antibiotic in isolated adipose cells. Arch. Biochem. and Biophys. 127:406-412, 1974.

- 9) Lockwood, E. : Studies of insuline-like actions of polyamines on lipid and glucose metabolism in adipose tissue cells. *Jour. Biol. Chem.* 249 (24): 7717-7722, 1974.
- 10) Diefsky, J. M. & Marshall, S. : Internalization and intracellular processing of insulin and insulin receptors in adipocytes. *Metabolism* 31 (7): 670-689, 1982.
- 11) Varandani, P.T. & Nafz M.A. : Insulin degradation. *Diabetes* 25 (3):173-179, 1976.
- 12) Lehninger, A. : *Bioquímica*. Ediciones Omega. Barcelona, España, pp. 736-750. (1983).
- 13) Pilkins, S.J. & Park, C.R. : Mechanism of action of insulin. *Diabetes* 20 (2):365-388, 1974.
- 14) Pegg, A. : Recent advances in the biochemistry of polyamines in eucaryots. *Bioche. Jour.* 243:249-263, 1988.
- 15) Cohen, S.S. : Introduction to the polyamines. Prentice-Hall International: 20-27, 1971.
- 16) Mendez, J.D. : Polyamines and human reproduction. en: *The Physiology of Polyamines*, Bachrach, U. and Heiser, Y. (Eds) Vol. I. C.R.C. Press. Inc., Florida, USA, pp. 23-38, 1980.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

79.

- 17) Heby, O. : Role of polyamines in the control of the proliferation and differentiation of the cells. *Metabolism* 19:1-20, 1981.
- 18) Bernasconi, S. & Reali, F. : Observation on the relationship between growth hormone and blood polyamines. *Recent progress in pediatric endocrinology*. Raven Press. New York. U.S.A., 1983.
- 19) Meyers, E. : *Farmacologia Clínica. El Manual Moderno*. S.A. México 1982.
- 20) Shipley, E. : Glucose tolerance in rats following repeated small doses of alloxan. *Diabetes* (37):313-320, 1975.
- 21) Elgavish, A. : Polyamines stimulate d-glucose transport in isolated renal brush-border membrane vesicles. *Bioch. et Bioph. Acta* 777: 1-8, 1984.
- 22) Dodds, R.A. : Putrescine may be a natural simulator of glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Fabs Letters*, 201 (1): 105-108, 1986.
- 23) Koenig, H. : Adrenergic stimulation of Ca^{+2} fluxes, endocytosis, hexose transport, and aminoacid transport in mouse kidney cortex is mediated by polyamine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 80: 7210-7214, 1983.

- 24) Koenig, H. : Polyamines regulate calcium fluxes in a rapid plasma membrane response. *Nature* 305 (5934): 530-534, 1983.
- 25) Triggle, D.J. : Ca^{+2} mobilization: new sites and signals. *Current Awareness Series*: 321-322, 1984.
- 26) Krupp, C. : Diagnóstico clínico y tratamiento. *El Manual Moderno, México*. pp. 767-793, 1985.
- 27) Cohen, M. : Influence of insulin on growth and metabolism of 7,12 dimethyl benz (a) anthracene-induced essey tumors, *Cancer Research* 34: 3245-3252, 1974.
- 28) Pedersen, O. : Insulin receptor binding and insulin action in human fat cells: effects of obesity and fasting. *Metabolism*, 31 (9): 884-894, 1982.
- 29) Saason, M. : Insulin and glucagon binding and stimulation of amino acid transport in isolated hepatocytes from streptozotocin diabetic rats. *Metabolism* 31 (8): 766-772, 1982.
- 30) Finn, F. : Insulin and receptor isolation studies. *Metabolism* 31 (7): 691-697, 1982.

- 31) Metz, R. : On that elusive disorder - hypoglycemia. Executive health report, 21 (2): 1-4, 1984.
- 32) Ginsberg, B.H. & Brown, T.J. : Regulation of insulin receptors in erythroid cells, Metabolism, 31 (7): 728-732, 1982.
- 33) Ercolani, L. & Lee, H. : Insulin - induced desensitization at the receptor and postreceptor level in mitogen-activated human T-lymphocytes. Diabetes, 34: 931-937, 1985.
- 34) Suzuki, K. & Kono, T. : Internalization and degradation of fat cell-bound insulin, The Journal of biological chemistry, 254 (19): 9786-9794, 1979.
- 35) Anderson, D.J. & Shaw, G.C. : Hyperglycaemia produced by the polyamines spermine and spermidine. B.J. Pharmac, 52: 205-211, 1974