

300627

2
2ej'



UNIVERSIDAD LA SALLE

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

**...S CON
FALLA DE ORIGEN**

**PROPIEDADES E IMPORTANCIA BIOQUIMICA DE
LA ORNITINA DESCARBOXILASA**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
MAYELA ALCARAZ VILLANUEVA**

MEXICO, D.F.

1989



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 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.

I N D I C E

RESUMEN	I
OBJETIVO	II
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	2
2.1 Distribución subcelular de la ornitina descarboxilasa (ODC)	2
2.2 Técnicas de localización	5
2.2.1 Localización inmunocitoquímica	7
2.2.2 Método indirecto de inmunofluorescencia (IF) ..	8
2.2.3 Técnica de inmunoperoxidasa (PAP)	9
2.2.4 Localización autoradiográfica	10
2.2.5 Localización histoquímica de la ODC mediante un inhibidor suicida como marcador citoquími co de la enzima	12
2.2.6 Localización microautoradiográfica de la ODC en animales intactos	15
2.2.7 Estudios preliminares para un método cito- químico cuantitativo de la ODC	17
III. AISLAMIENTO Y PURIFICACION	19
3.1 Purificación	19
3.1.1 Purificación de la ODC de <i>Escherichia coli</i>	23
3.1.2 Purificación de la ODC de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
3.1.3 Purificación de la ODC de <i>Physarum</i> <i>polycephalum</i>	29
3.1.4 Purificación de la UDL de hígado de de ternera tratado con tiacetamida	29
3.1.5 Purificación de la ODC de hígado de de rata tratado con tiacetamida	30
3.1.6 Purificación de la ODC de riñón de ratón	30
3.2 Estimación de la pureza	30
3.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS ..	31

3.2.2 Técnica de doble difusión de Duchterlony	35
3.3 Actividad específica y su determinación	35
IV. PROPIEDADES DE LA ORNITINA DESCARBOXILASA	37
4.1 Cofactores	37
4.2 Coenzimas	39
4.3 Propiedades fisicoquímicas de la ODC de diferen- tes fuentes	43
4.3.1 Peso molecular y subunidades	43
4.3.2 Punto isoeléctrico y pH óptimo	52
4.3.3 Valores de Km, Vmáx y sustrato específico	52
V. REGULACION	54
5.1 Control a nivel de la síntesis de RNA	55
5.2 Control traduccional por poliaminas	55
5.3 Inducción de una antienzima o su liberación por poliaminas	56
5.4 Transiciones entre una forma activa y una menos ac- tiva (isoenzimas o formas múltiples)	62
5.5 Regulación por hormonas	64
5.6 Estimulación e inhibición de la actividad de la ODC por varios nucleótidos de guanina	67
5.7 Control osmótico de la ODC por cationes monove- lentes	67
5.8 Regulación de la ODC a nivel molecular	68
VI. INHIBICION	72
6.1 Análogos estructurales de ornitina y putrescina	72
6.2 Alquil y aril ornitinas sustituidas	74
6.3 Ácido 5-amino-2-hidrazino valérico (alfa-hidrazino ornitina)	74
6.4 Ácido 5-amino-2-hidrazino-2-metil pentanoico	80
6.5 Otros análogos de ornitina	80
6.6 Análogos de putrescina	83
6.7 N (5 -fosfopiridoxil)ornitina	84
6.8 Inhibidores que compiten por el fosfato de piridoxal	84
6.9 Represores de la ODC	85
6.10 8-azaquina y 5-azacitidina	87
6.11 1,4 diaminobutino	87
6.12 Poliaminas	87
6.13 DL-alfa-difluorometilornitina (DL-alfa-DFMO)	88
VII. IMPORTANCIA CLINICA Y PERSPECTIVAS TERAPEUTICAS	93
7.1 Embriogénesis	93

7.2	Cáncer y tumores	97
7.2.1	Poliaminas en el tratamiento de la prostatitis	97
7.2.2	Actividad de la ODC como un componente esencial en la promoción de tumores	98
7.2.3	Inhibición del crecimiento tumoral	99
7.2.5	La ODC como indicador del grado de maligni- dad de tejidos neoplásticos humanos	100
7.2.6	Quimioterapia del cancer	103
7.3	Psoriasis	104
7.4	Infecciones	104
7.4.1	Tripanosomiasis	106
	7.4.1.1 Trypanosoma brucei rhodesiense	109
7.4.2	Coccidiosis	110
7.4.3	Malaria	111
7.4.4	Otros efectos antiprotozoarios de los inhibidores de la ODC	112
7.4.5	Efectos antivirales de los inhibidores del metabolismo de poliaminas	113

VIII.	CONCLUSIONES	115
-------	--------------------	-----

	BIBLIOGRAFIA	114
--	--------------------	-----

RESUMEN

La ODC es una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza determinándose su localización, a través de diversas técnicas, en el citoplasma celular y en el núcleo, particularmente en el nucleolo.

La actividad de esta enzima puede inducirse en respuesta a la acción de hormonas, drogas, regeneración de tejidos, factores y agentes promotores del crecimiento normal y tumoral, lo que permite su cuantificación, aislamiento y purificación. Además la ODC requiere, para mantener su actividad, de una coenzima y un cofactor y sus propiedades fisicoquímicas varían de acuerdo a la fuente de estudio.

La ODC es regulada principalmente por isoenzimas y anti enzimas de la misma y por hormonas a nivel transcripcional y/o transduccional.

La actividad de la ODC puede inhibirse por diversas sustancias, siendo una de las más efectivas la DFMD, la cual se une irreversiblemente a la enzima. El estudio de los inhibidores de la ODC in vivo abre nuevas perspectivas de investigación, ya que los resultados obtenidos en parasitosis experimentales y en humano, han sido positivos.

OBJETIVO: Revisar las propiedades de la ornitina descarboxilasa (ODC) y sus isoenzimas presentes en diferentes sistemas celulares con particular énfasis en el humano, ya que esta enzima es responsable de la síntesis de poliaminas además de regular la expresión genética. Las poliaminas, producto de su actividad, regulan diversas reacciones metabólicas implicadas en la división, diferenciación y proliferación celular en procesos normales y patológicos, por lo que la inhibición específica de esta enzima puede tener aplicaciones terapéuticas.

CAPITULO I. INTRODUCCION

Las enzimas son productos específicos de las células y su actividad catalítica así como su cantidad se utilizan como indicadores del estado funcional de la célula. La localización celular y subcelular de las enzimas es un parámetro importante en los estudios de diferenciación e identificación de células específicas.

La ornitina descarboxilasa (L-ornitina descarboxilasa, ODC, EC. 4.1.1.17) convierte la ornitina a putrescina en el primer paso de la biosíntesis de poliaminas (1-13, 16, 114) al mismo tiempo que la regula (1-3, 16).

La enzima fue reportada por primera vez en 1940 por Gale bajo condiciones que sugieren un papel catabólico de la ODC. Posteriormente, Morris y Pardee describieron una enzima biosintética en *Escherichia coli*. Al siguiente año, la ODC fue descrita en próstata de rata por Pegg y Williams-Ashman. Después la misma enzima fue reportada por Russell y Snyder en hígado de rata regenerado, en embrión de pollo y varios tumores. La ODC es una de las enzimas que in vivo tiene una vida media más corta que la reportada para una enzima en sistemas de mamíferos (114).

Ha surgido cierta controversia con referencia a la localización celular de esta enzima con base a estudios en los cuales la actividad de la enzima fue ensayada utilizando diferentes extractos de fracciones celulares, se estableció que la ODC estaba presente exclusivamente en el citoplasma celular (5, 6).

El uso de inhibidores específicos e irreversibles de la ODC como la DL-alfa-difluoroetilornitina (DFMO), han permitido la realización de varios estudios en Francia sobre su localización subcelular y se ha demostrado que esta presente no solamente en el citoplasma, sino también en el nucleolo y nucleoplasma de células metabólicamente activas, lo que sugiere que la ODC es una proteína con funciones tanto en la síntesis de poliaminas como en la regulación de la expresión genética (8-10).

La actividad de la ODC se ha observado en relación con enfermedades como psoriasis, carcinoma de próstata, malaria, etc. (7, 23, 53, 83).

CAPITULO II. GENERALIDADES

La ornitina descarboxilasa (ODC) es una enzima con gran importancia bioquímica y fisiológica por lo que su actividad se ha estudiado en organismos eucariotes y procariotes (39, 46, 48). Esta enzima cataliza la conversión de L-ornitina a putrescina (19) a la vez que regula la biosíntesis de poliaminas (2, 3, 6, 7, 22). La biosíntesis de poliaminas en los mamíferos se presenta en la figura 2.1 (91).

La ornitina disponible para estas reacciones proviene del plasma, además de que puede formarse dentro de las células, por la acción de la arginasa. Es posible que esta última enzima, ampliamente distribuida en los diferentes tejidos, se encuentre presente en tejidos extrahepáticos para facilitar la disponibilidad de ornitina para la biosíntesis de poliaminas (91).

La actividad de la ODC es extremadamente sensible a varios factores siendo normalmente muy baja en un sistema con un equilibrio en la concentración de putrescina (21). Su actividad puede elevarse varias veces, como respuesta a la acción de hormonas, drogas, regeneración de tejidos, factores y agentes promotores del crecimiento normal (4, 10, 91) y tumoral (7).

Recientemente han sido sintetizados varios aminoácidos alfa-difluorometilados que han permitido realizar estudios sobre la función de las poliaminas en el desarrollo y regeneración celular (48).

2.1. DISTRIBUCION SUBCELULAR

Algunos de los estudios concernientes a la ODC están orientados a las alteraciones en su actividad y otros a la localización celular exacta de la misma (6).

La actividad de la ODC se ha detectado en extractos de diferentes células eucariotes y procariotes. Es probable que los niveles basales y las actividades inducidas de la enzima en diferentes tipos de células dentro de un mismo tejido sean muy grandes. Por esta razón se hacen necesarios métodos directos para la localización y cuantificación de la enzima presente en las secciones de tejido.

Ha surgido cierta controversia sobre la localización subcelular de la ODC (67). Con base en estudios en los cuales se ensayo la

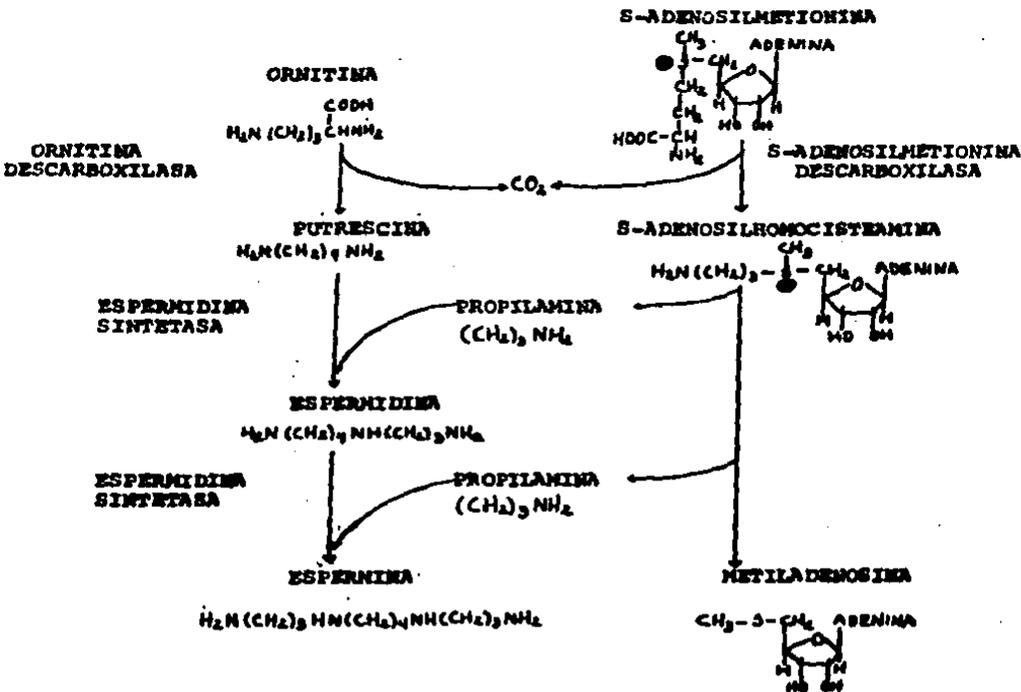


Fig. 2.1 Biosíntesis de poliaminas (91).

actividad de la enzima utilizando extractos de diferentes fracciones subcelulares se concluyó que la ODC estaba presente exclusivamente en el compartimiento citosólico de la célula (48, 67), sin embargo, la presencia de la enzima ha sido reportada en el núcleo (48).

Recientemente, se han obtenido evidencias bioquímicas, que indican que la mayor parte de la ODC se encuentra presente en el citoplasma celular y una fracción de la misma en el núcleo, particularmente en el nucleolo (5-7, 9, 22, 49, 67).

Emanuelson y Heby, utilizando la formación de un complejo marcado con DL-alfa-DFMD, un inhibidor irreversible de la ODC, demostraron que la enzima no solamente esta presente en el citoplasma sino también en el nucleolo y nucleoplasma de células metabólicamente activas (67), lo que sugirió que la ODC es una proteína multifuncional con un papel tanto en la síntesis de poliaminas como en la regulación de la expresión genética (6, 9, 67).

La localización de la ODC en el núcleo concuerda con lo propuesto por Russell y Mannen. Ellos proponen que la enzima estimula la activación de la polimerasa-1 del RNA por una afinidad de la ODC a la misma (7, 21, 114). Si tal asociación existe dentro de la célula, una consecuencia sería una alteración en la disponibilidad de la ODC y por tanto en la actividad. En apoyo de este concepto la ODC puede ser encontrada en el núcleo existiendo una relación estrecha entre la actividad de la enzima y la síntesis de RNA (21, 114).

Estudios realizados en hígado de rata demuestran que la ODC se encuentra asociada con el mRNA de polisomas libres, indicando que la enzima es sintetizada en estos, de acuerdo con la localización citosólica de la misma (8).

La ODC es el componente minoritario de la proteína total soluble en algunas células. Por ejemplo, en el hígado de rata la ODC representa cerca de una parte en 60 000 000 de la proteína total soluble y después de una inducción máxima por una combinación de inductores de la proteína es sólo una parte en 35 0000 (7).

Se ha observado que en el riñón de ratón estimulado con andrógenos la ODC sólo constituye 0.01% de la proteína citoplásmica total y 0.00012% en hígado de ratas estimuladas con tioacetamida (7, 10, 91).

La enzima purificada a homogeneidad aparente de hígado de rata representa solamente cerca del 0.0002% de la proteína citoplásmica de la misma cuando se realiza una inducción máxima (11).

En hígado de pollo, solo una pequeña fracción de la ornitina es descarboxilada a putrescina y utilizada para la síntesis de poliaminas localizándose la ODC en el citosol (22), y una pequeña parte de la misma es metabolizada en el núcleo (22).

Algunos estudios realizados en linfocitos T humanos muestran que al tratarse con mitógenos o lectinas se induce rápidamente la activación de la ODC a través de un mecanismo independiente de la síntesis de proteínas que requiere de energía y un citoesqueleto intacto. Al mismo tiempo se estudian los eventos químicos principales de la síntesis de proteína independientes de la activación de la ODC preexistente durante la transducción de las señales mitogénicas de los receptores de la membrana plasmática al interior de las células (5).

Se han descrito un sin número de proteínas unidas por fosfatidilinositol (PI) a la superficie externa de la membrana plasmática. Tales proteínas incluyen fosfatasa alcalina, acetilcolinesterasa (5, 17) y la proteína básica mielina. Estas proteínas pueden ser liberadas de la membrana por enzimas específicas fosfatidilinositol-fosfolipasas de diferentes bacterias. Las estructuras no proteicas se encuentran enlazadas al fosfatidilinositol en la superficie interna de la membrana.

La inducción de la actividad de la ODC por mitógenos en linfocitos T humanos es inhibida por Li^+ 1mM ya que es un inhibidor selectivo de inositol-1-fosfatasa, enzima limitante en la producción de inositol (5).

La ODC es una molécula que contiene inositol covalentemente unido y puede ser activada por una fosfatidilinositol-fosfolipasa C específica, evidencia que indica que la ODC está unida al PI y su actividad enzimática se eleva varias veces cuando la molécula se encuentra unida a la parte diacilglicérica de la molécula (Figura 2.2).

Se ha demostrado que la existencia de una ODC inactiva en linfocitos T humanos. En estas células la ODC se activa rápidamente por mitógenos al igual que en presencia de ciclohexamida. Esta activación por síntesis "de novo" la cual comienza de 1 a 2 horas después de la estimulación. Estos resultados concuerdan con el concepto de que la ODC activa se localiza en el citosol de células en proliferación (unida al PI) (5).

2.2 TECNICAS DE LOCALIZACION

Existen varios métodos citoquímicos para la localización de las enzimas, los cuales se pueden dividir en dos categorías: la primera, basada en la visualización de los productos de reacción catalizada por la enzima y la segunda, basada sobre la generación de un anticuerpo específico contra la enzima (por ejemplo la inmunocitoquímica).

El uso de inhibidores irreversibles específicos para la

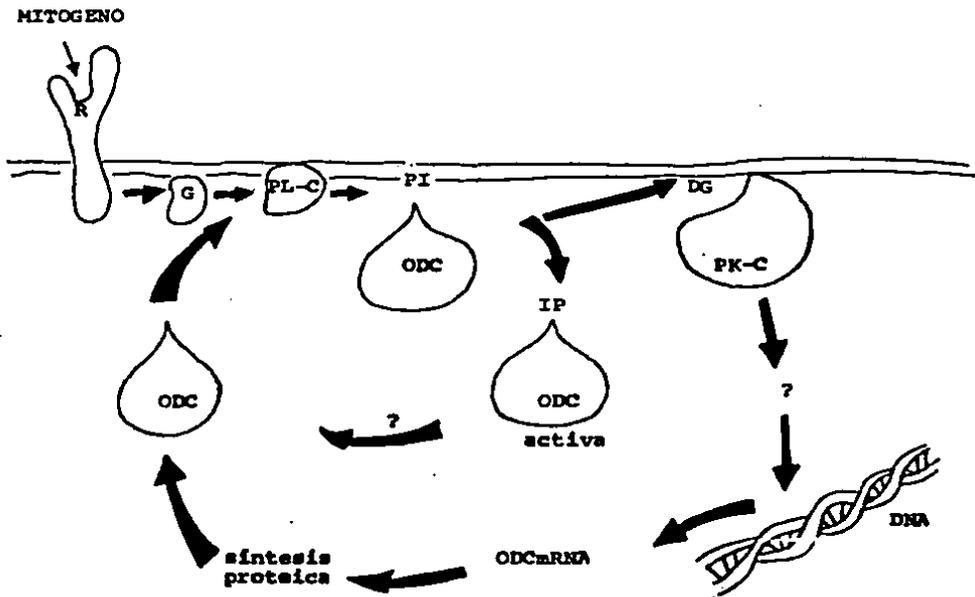


Fig. 2.2 Modelo propuesto para la activación de la ODC (5).

R= receptor del mitógeno
G= proteína G
PLC= fosfolipasa C
PI= fosfatidilinositol
IP= inositol-1-monofosfato
DG= diacilglicerol
PK-C= proteína cinasa C

localización a nivel celular y subcelular de enzimas tiene importancia en los estudios de diferenciación e identificación de células específicas (24).

Varias técnicas se emplean para la localización de la ODC entre las cuales encontramos:

2.2.1 LOCALIZACIÓN INMUNOCITOQUÍMICA

Las técnicas inmunocitoquímicas son utilizadas frecuentemente como instrumentos para la localización de pequeñas concentraciones de péptidos y proteínas, incluyendo enzimas (4).

Esta técnica se basa en la generación de un anticuerpo específico y potente contra la enzima (4, 24, 27).

La ODC fue purificada a homogeneidad aparente a partir de riñones de ratón tratados con testosterona. Utilizando la enzima purificada fue posible generar un antisuero de título alto conteniendo anticuerpos monoespecíficos contra la ODC. Estos anticuerpos se utilizan para la localización inmunocitoquímica de la enzima en riñones de ratón tratados con testosterona y en ovarios de rata prepubéres tratadas con HGC (gonadotropina coriónica humana) (4).

Los siguientes hechos sugieren que los anticuerpos generados son específicos contra la enzima y de aquí que la inmunoreactividad de la ODC refleje su presencia (6):

- 1) La enzima purificada exhibe una banda en electroforesis en gel de poliacrilamida.
- 2) La actividad específica de la enzima purificada concuerda con el valor teórico de la enzima pura.
- 3) La enzima purificada presenta una banda de precipitación contra su antisuero en la técnica de doble inmunodifusión de Duchterlony.
- 4) No se observa inmunoreactividad en controles castrados.
- 5) La administración de diaminopropano (DAP), un represor no fisiológico de la ODC, reduce considerablemente la inmunoreactividad renal y,
- 6) La marcada reducción en el material inmunoreactivo en riñones después de ser tratados con cicloheximida concuerda con el recambio de la ODC.

La metodología para la realización de esta técnica es la siguiente (4, 6, 47):

- 1) El modelo de laboratorio es perfundido vía corazón con una solución fría de formaldehído (4% de formaldehído en buffer de fosfato 0.1M, pH 7.2).
- 2) Después se añade ditiotreitól 5mM como fijador (en experimentos pilotos se mostró que el ditiotreitól aumenta la inmunoreactividad de la enzima).
- 3) Las muestras de riñones se sumergen toda la noche en

una solución de formaldehído como la indicada en el punto uno.

4) Posteriormente las muestras se sumergen en buffer de fosfato conteniendo de 5 a 25% de sacarosa, son congeladas en hielo seco y seccionadas en un criostato de 10 a 15 μ m.

5) Las secciones son procesadas para la demostración inmunocitoquímica de la ODC utilizando un antisuero de conejo (código no. 81111) obtenido contra la enzima purificada de riñones de ratón tratados con testosterona. El sitio de reacción del complejo antígeno-anticuerpo es revelado por la técnica indirecta de inmunofluorescencia (IF) de Coons et al o por el método de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (4, 6, 47).

El antisuero es utilizado en dilución 1:640 en riñón o 1:80 en ovario y placenta.

En el proceso de inmunofluorescencia el sitio de reacción antígeno-anticuerpo es revelado por fluoresceína isotiocianato (FITC), designado como anti-IgG de conejo, diluido 1:20. Todas las soluciones contienen 0.25% de seroalbumina humana y 0.25% de Triton X-100. Las secciones son enjuagadas y fijadas en buffer de fosfato salino (PBS) (4, 6).

La localización de la ODC por inmunocitoquímica es limitada por dos razones principales: una son las cantidades extremadamente pequeñas de la enzima presentes en los tejidos. La otra es debido a la falta de un antisuero específico y de título alto contra la ODC (4).

El método probablemente no podría distinguir entre la enzima activa o inactiva; ni demostraría la enzima si los sitios antigénicos fueran enmascarados por ejemplo por unión a alguna proteína, o no se encuentre inmediatamente disponible para el antígeno.

La localización de la enzima también dependerá críticamente de las condiciones bajo las cuales son preparadas y tratadas las secciones de tejido con los anticuerpos (114).

2.2.2. METODO INDIRECTO DE INMUNOFLUORESCENCIA (IF)

Este método desarrollado por Coons et al, se basa en la formación de un anticuerpo específico (usualmente de conejo) de la ODC para el antígeno presente en la sección de tejido demostrándose el sitio de reacción del complejo antígeno-anticuerpo por el uso de un anticuerpo fluorocromado marcado contra las inmunoglobulinas del conejo (8, 47) (Figura 2.3).

En esta técnica se utiliza antisuero diluido 1:2560 en riñón o 1:320 en ovario. Las secciones de tejido son lavadas en PBS conteniendo 0.25% de Triton X-100 e incubadas con anti-IgG de conejo-oveja diluido 1:30. Las secciones se lavan nuevamente y se incuban con el complejo peroxidasa-antiperoxidasa de conejo

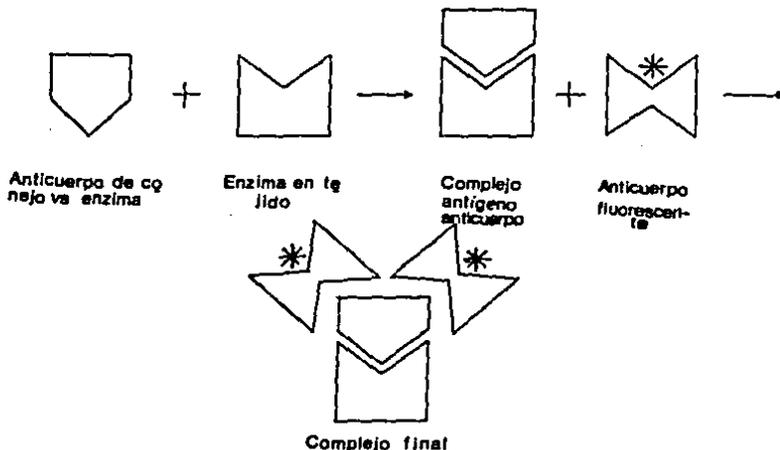


Fig. 2.3 Método indirecto de inmunofluorescencia (47).

diluido 1:160 y posteriormente en buffer TRIS, pH 7.6. La actividad de peroxidasa se visualiza por incubación con 3, 3' tetrahidrocloro diaminobenzidina, 60 mg/100 ml, y 0.01% de peróxido de hidrógeno en buffer TRIS 0.05M, pH 7.6. Después de la tinción, las secciones son enguajadas en PBS conteniendo 0.25% de Triton X-100 y fijadas en buffer de fosfatoglicerina (4).

2.2.3. TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA (PAP)

Este método, desarrollado por Sternberger, al igual que el anterior se basa en la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Un segundo anticuerpo es utilizado en exceso uniéndose al anticuerpo primario en los dos sitios libres del complejo. La sección de tejido se incuba con un complejo soluble de peroxidasa y antiperoxidasa que se unirá al sitio libre del segundo anticuerpo. Finalmente se revela la actividad de la peroxidasa (47) (FIGURA 2.4).

La metodología para esta técnica es similar a la de IF exceptuando el último paso donde las secciones teñidas son enguajadas con PBS conteniendo 0.25% de Triton X-100 y fijadas en resina después de la deshidratación (4).

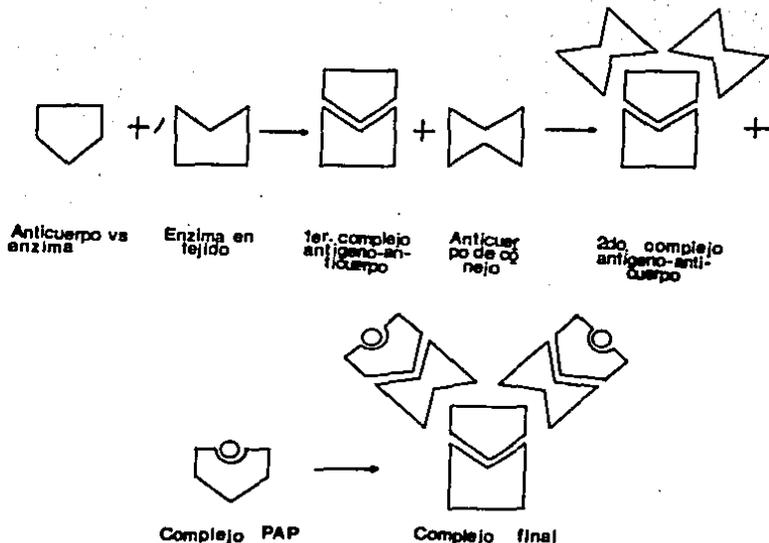


Fig. 2.4 Técnica de inmunoperoxidasa (47).

Las técnicas antes mencionadas son empleadas, por ejemplo, para la localización de la ODC en rífon de rata tratado con testosterona, ovarios de rata tratados con HGC, placenta de rata y tejido neuronal debido a que estos tejidos contienen una gran actividad de la enzima (4, 6, 47).

2.2.4. LOCALIZACION AUTORADIOGRAFICA

El principio de esta técnica es el siguiente: la alfa-DFMO es un inhibidor irreversible que forma un enlace covalente específico (7) con la ODC cuando se incuba con la enzima bajo condiciones que le permitan a esta descarboxilar la droga. La alfa-DFMO penetra fácilmente dentro de las células cuando se administra a animales. Por consiguiente, la única macromolécula celular marcada cuando se administra DFMO radioactiva, es la ODC.

Si los animales se tratan con DFMO marcada (^{14}C -DFMO) (4, 105) y los tejidos se fijan y lavan para remover la droga, la radioactividad residual limita a la ODC utilizándose para localizar la enzima.

Es posible que la entrada de la DFMO dentro de algunas células ocurra de un modo mas extenso que en otras; esto podría producir un resultado parcial basado en el hecho de que la enzima se marca completamente en células con una mayor concentración del

inhibidor. Por tanto esta posibilidad es regulada por el uso de una concentración de DFMO que neutralize toda la actividad de la enzima presente en el tejido en estudio. Hay una reacción estequiométrica de la DFMO con la enzima por lo que esta se inactiva irreversiblemente. Por tanto, todas las moléculas de enzima inactivadas están marcadas; cuando se pierde toda la actividad toda la enzima se encuentra marcada.

Este proceso se utiliza con pequeñas variaciones para otros tejidos distintos al riñón de ratón en los cuales puede llevarse a cabo la descripción in vivo de la ODC.

La metodología para efectuar esta técnica es la siguiente:

1) Los ratones son anestesiados con éter y los tejidos se fijan por perfusión cardiaca con 10% de buffer neutro de formalina a una presión de 120 mmHg.

2) Los tejidos son extirpados, fijados y lavados por inmersión por un mínimo de tres días cambiando el fijador de dos a tres veces diarias.

3) Después de fijarse los tejidos se cubren con cera de poliéster y se seccionan a 10 μ m.

4) Para investigar la localización regional de la enzima dentro del riñón las secciones se exponen al ultrafilm LKB (⁺3H) en un cassette de rayos X por cuatro semanas a 4°C.

5) Las películas son reveladas por cinco minutos en D-19 (Kodak). Una vez reveladas son examinadas para proporcionar una valoración cualitativa de la localización de la enzima. Una valoración cuantitativa pudiera obtenerse utilizando lecturas densitométricas en un densímetro Tobias.

El mayor factor limitante de esta técnica es la cantidad tan pequeña de la ODC presente en los tejidos y la actividad específica de la DFMO radiactiva (el riñón de ratón contiene 4900 unidades por gramo de peso húmedo de ODC).

Ventajas y limitaciones de la autoradiografía

La mayor ventaja de este método es su simplicidad ya que no requiere reactivos bioquímicos tales como anticuerpos monoespecíficos. El ataque covalente de la DFMO a la proteína en los tejidos proporciona una ventaja diferente permitiendo el uso de una metodología convencional para microscopía.

Los resultados obtenidos son totalmente adecuados para determinar la distribución de la enzima dentro de los organelos subcelulares de una célula simple. El procedimiento podría ser también valioso para el seguimiento de la degradación de la ODC, ya que se ha demostrado que la enzima inactivada con DFMO es degradada in vivo por la misma ruta que la enzima nativa debido a que esta tiene gran especificidad por la enzima in vivo (100).

El gran inconveniente de este proceso es que la incorporación de la DFMO en la ODC requiere la exposición de la enzima bajo

condiciones en las cuales esta es enzimáticamente activa. Además, sólo una molécula de DFMO puede unirse por molécula o subunidad de ODC. La enzima esta presente en algunas células en cantidades muy pequeñas y por consiguiente es necesaria una actividad específica alta de la DFMO a fin de incorporar suficiente radioactividad aún cuando toda la enzima se inactiva. La ODC es una enzima muy labil y por consiguiente, sólo la exposición de la droga en secciones de tejido recientemente aisladas o la administración de la DFMO in vivo tienen éxito.

Este método no puede usarse para cuantificar la ODC en estado de inactividad crítica (48).

2.2.5 LOCALIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE LA ODC MEDIANTE UN INHIBIDOR SUICIDA COMO MARCADOR CITOQUÍMICO DE LA ENZIMA

La afinidad de identificar los constituyentes de proteína marcados en células viables con ligandos fluorescentes han sido extensamente usados para estudiar los cambios dinámicos en la localización, cantidad y regulación de estas moléculas in situ.

Este marcaje se ha llevado a cabo por el uso de análogos fluorescentes y la distribución de los correspondientes receptores de membrana han sido estudiados.

Los estudios de las proteínas intracelulares son complicados por la existencia de una barrera de la membrana plasmática. Para evitar este problema han sido utilizadas para estudiar estas proteínas microinyecciones intracelulares de proteínas marcadas con ligandos fluorescentes dentro de las células vivas. Sin embargo, esta técnica podría ser defina para la célula.

La habilidad de penetración del ligando fluorescente marcado podría claramente ser una gran ventaja en estudios del comportamiento de proteínas intracelulares.

Un derivado fluorescente de metotrexato ha sido recientemente desarrollado, el cual retiene las características inhibitorias para la enzima, deshidratato reductasa, de este precursor insustituible.

Además, este inhibidor marcado puede ser transportado y acumularse específicamente en células viables las cuales contienen la enzima. Usando una vía similar se ha sintetizado un derivado fluorescente marcado (rodamina) de la alfa-DFMO. Este nuevo compuesto, el cual retiene más de las características inhibitorias de la alfa-DFMO se ha utilizado para la localización de la ODC en secciones de tejido.

Este inhibidor fluorescente puede ser visualizado dentro de células viables (99).

El método, presentado por Gilad y Gilad, se basa en la presencia de la característica específica e irreversible del inhibidor DFMO seguido de la conjugación con moléculas marcadas.

El inhibidor se conjuga con la molécula fluorescente rodamina-beta-isotiocianato (4, 48) y la localización del complejo formado en secciones de tejido es detectado directamente por fluorescencia citoquímica. Alternativamente la alfa-DFMO se conjuga con biotina y su localización citoquímica se determina indirectamente por su unión con avidina conjugada y la visualización del producto de reacción de la peroxidasa de rábano.

Ambas moléculas inhibitoras fueron localizadas con éxito citoquímicamente dentro de células específicas de cerebelo de rata (24, 105) en hígado de rata seguido de una inyección de tiacetamida donde la actividad de la ODC se intensifica enormemente.

Esta técnica sería de aplicación general:

- 1) En otros tejidos,
- 2) Para otras enzimas y,
- 3) En estudios de microscopia electrónica para la localización ultraestructural de la enzima.

Hay dos métodos para la localización citoquímica:

- 1) El método directo utiliza un marcador fluorescente (por ejemplo rodamina) y,
- 2) El método indirecto que se basa en la gran especificidad y la unión fuerte de avidina a biotina que es el limitante del inhibidor.

Utilizando el método directo la localización del inhibidor es indicada inmediatamente por la fluorescencia del marcador.

El método indirecto se basa en la localización del producto de la reacción de una enzima (por ejemplo peroxidasa de rábano) la cual se conjuga a la molécula de avidina y este producto señala indirectamente la localización del inhibidor.

La metodología es la siguiente: se utilizan ratas blancas de la cepa Wistar con un peso entre 300-320 g dándoles agua y comida ad libitum. Se mantienen a 25°C durante 12 horas con luz tenue. Se les inyecta tiacetamida intraperitonealmente (150mg/kg) y 20 horas después los animales se preparan para el estudio citoquímico de la ó inducida en el hígado.

Para la citoquímica del cerebro, las ratas son perfundidas a través del corazón con una solución salina de buffer de fosfato (pH 7.4) conteniendo sacarosa 0.32M (PBS), seguido de una solución fijadora de PBS conteniendo 1.25% de glutaraldehído y 1% de formaldehído. Los cerebros se seccionan, el cerebelo se disecciona y posteriormente se fija en la solución fijadora fría por una a dos horas.

Para la citoquímica del hígado las ratas perfundidas con P55 y las secciones de hígado se fijan en la solución fijadora de PBS como se describió anteriormente.

Una vez fijados los tejidos se cortan y congelan en secciones de 15 a 25 μ m. Estas secciones se colocan en un portaobjetos cubierto con una capa de grenetina (0.5% P/V en agua) seca completamente bajo una corriente de aire, y después se tiñen.

Método directo. Citoquímica fluorescente.

Las secciones se lavan brevemente en PBS, se incuban en una cámara húmeda de una a dos horas a 37°C con una tinción (10-50 μ M de inhibidor (rodamina) en PBS) conteniendo fosfato de piridoxal 60 μ M, se lavan nuevamente con PBS y se montan en glicerol: PBS, pH 7.2 (4:1 V/V).

Las secciones se observan con iluminación de luz incidente de un microscopio fluorescente utilizando el objetivo como un condensador en un microscopio Zeiss.

Método indirecto. Citoquímica biotina-avidina.

Las secciones se lavan como se describió anteriormente y se incuban con el inhibidor de biotina (10-50 μ M en PBS) por una a dos horas a 37°C en peroxidasa-avidina (0.25-0.75 mg/ml en PBS), en PBS conteniendo 0.05% de clorhidrato de terdiaminobenzidina y 0.02% de H₂O₂ por cinco a treinta minutos y montada en resina. Los tejidos se lavan con PBS en cada paso.

Los portaobjetos teñidos por la reacción catalizada por la peroxidasa se examinan al microscopio.

Para ambas técnicas las fotos en blanco y negro se toman en Kodak Tri-X400 ASA y las fotografías en color en Kodak Ektachrome 200 ASA (24).

Se ha cuestionado la validez del método de localización histoquímica fluorescente ya que no es claro como el complejo de la DFMD con rodamina o biotina reacciona con la enzima, ya que la ODC no reconoce sustratos con grupos amino bloqueados (4, 48) y la reacción entre la enzima y estos complejos ocurre aparentemente en secciones en las cuales el tejido se ha fijado con formaldehído o glutaraldehído.

No hay información disponible sobre las estructuras químicas de los complejos, estequiometría de su reacción con la ODC o la especificidad de los mismos (48).

Una gran desventaja de esta técnica es el hecho de que es dependiente de la preservación de la actividad de la enzima en la

sección de tejido (6), y sólo puede usarse para la localización in vitro de la enzima. La especificidad de los anticuerpos usados para esta técnica representa otro problema (105).

La exitosa localización citoquímica de la ODC utilizando esta técnica tendría importantes aplicaciones para los biólogos. Primero, por la utilización de inhibidores irreversibles de la enzima altamente específicos para su localización, lo que permite su uso para validar la especificidad de la localización inmunocitoquímica cuando los anticuerpos contra las correspondientes enzimas se encuentren disponibles. Segundo, otros inhibidores alfa amino fluorometilados de aminoácido descarboxilasas se encuentran ahora disponibles y este método sería rápidamente aplicable para otras enzimas. Tercero, el papel de las poliaminas en el crecimiento del tejido y su reacción a varios estímulos hormonales hace que la localización citoquímica de la ODC sea más importante. Cuatro, el papel de la ODC en el crecimiento neuronal y en la regeneración del nervio hace que esta técnica sea de aplicación inmediata (24).

2.2.6. LOCALIZACIÓN MICROAUTORADIOGRÁFICA DE LA ODC EN ANIMALES INTACTOS

Los alfa-halometil aminoácidos actúan como inhibidores irreversibles de las aminoácido descarboxilasas dependientes de fosfato de piridoxal. Estos inhibidores son moléculas relativamente no reactivas, con estructura similar al sustrato, que reaccionan con el sitio activo de la enzima. Después se convierten a especies reactivas las cuales pueden formar un enlace covalente con un grupo funcional del sitio activo de la enzima produciendo su inactivación. Entonces, la especificidad de estos inhibidores no solamente está basada en su similitud con los sustratos, sino también con el mecanismo de acción de la enzima la cual implica un alto grado de selectividad.

La habilidad de los inhibidores irreversibles de la enzima es apta para proveer una especificidad y un medio preciso para la localización de las enzimas in vitro como in vivo.

Esta técnica se basó en la siguiente metodología: se utilizaron ratones machos de la cepa NMRI (con peso de cerca de 30 g) a los que se les dió comida y agua ad libitum. Cuatro semanas antes del experimento se les suministró fenpropionato nandrolona (la nandrolona es un esteroide anabólico) suspendido en aceite de arachis (100 mg/50 ml) e inyectados durante cuatro días (100 g/ratón/día). Los controles recibieron un volumen equivalente de aceite de arachis.

1) AUTORADIOGRAFÍA DE ANIMALES INTACTOS

Los ratones controles y los tratados con nandrolona se inyectan por vía intravenosa con 100 Ci ^3H -alfa-DFMD en 0.2 ml de NaCl al 0.9%. Los ratones se sacrifican cuatro horas después de las

inyecciones por estríxia con CO_2 , se fijan en gel de carboximetilcelulosa y se sumergen en dióxido de carbono-n-hexano frío (-78°C). Se cortan secciones sagitalmente de $20\ \mu\text{m}$ completamente congeladas con un microtomo a -15°C . y se procesan, de acuerdo a Ullberg (105).

Se toman secciones de cada ratón secundólas y congelándolas. Para localizar la banda radioactiva en el tejido la sección se lava sucesivamente con ácido tricloroacético (TCA) al 5% en agua, metanol y heptano por 0.5 minutos, respectivamente. Las secciones se secan y colocan sobre una película de rayos X junto con las secciones adyacentes. El tiempo de exposición es de diez minutos.

2) MICROAUTORADIOGRAFIA

Los ratones controles y los tratados con nandrolona se inyectan por vía intravenosa con $100\ \mu\text{Ci}$ ^3H -alfa-DFMD. Los ratones se sacrifican cuatro horas después y las piezas de riñones removidas se fijan en formaldehído al 4% en buffer de fosfato (pH 7.0). Después de fijarse, los tejidos se deshidratan con etanol e incluyen en parafina. Se marcan secciones de $5\ \mu\text{m}$, se cortan y montan en portaobjetos. Después de la deparafinización de las secciones en etanol, los portaobjetos se rocían con una emulsión líquida de NTB2 (kodak-Eastman) y se almacenan por cuatro semanas a 4°C . Después de la exposición, los portaobjetos son teñidos con haematoxilín-eosina. Se asume que los microautoradiogramas hechos bajo estas condiciones son correctas en las secciones de tejido presentándose una banda radiactiva.

Esta técnica representa una nueva aproximación para mostrar la microlocalización de una enzima in vivo en un animal intacto (105).

A través de los diversos métodos de localización de la enzima se ha obtenido la siguiente información:

1) La localización inmunocitoquímica de la ODC en riñón de rata tratado con testosterona demuestra que la mayor parte, sino toda, está localizada en la parte citoplásmica de las células (4, 6) de la parte cortical. En ovarios de ratas tratadas con HGC (gonadotropina coriónica humana), la ODC se localiza en la capa que rodea los folículos y en el tejido de la glándula intersticial del ovario (4).

2) La localización autoradiográfica de la enzima ha permitido demostrar que la mayor parte de la ODC inducida con andrógenos en el riñón de ratón se encuentra en el citoplasma de las células de los túbulos proximales, y en algunos gránulos en el núcleo (aún cuando la resolución del método no es suficiente) (4, 7, 4B, 100).

3) La técnica de localización histoquímica fluorescente ha permitido demostrar la presencia de la ODC en la capa granular interna del cerebelo de ratón (24).

4) La técnica de microautoradiografía nos permite realizar una localización muy detallada de la ODC en riñón de

ratón encontrándose en las asas descendientes de Henle y en los túbulos proximales (105).

2.1.7. ESTUDIOS PRELIMINARES PARA UN MÉTODO CITOQUÍMICO CUANTITATIVO DE LA ODC

En la citoquímica normal, la actividad de una enzima tal como una fosfatasa o descarboxilasa podría medirse por precipitación de una liberación de dióxido de carbono o de fosfato. Con cuidado el ion precipitado podría ser secuestrado del sitio activo de la enzima.

La localización de la enzima no es el interés primario de tales técnicas tanto como los productos de la actividad de la enzima los cuales son retenidos dentro de la célula que contiene esa actividad.

Sin embargo, una serie de procedimientos han sido desarrollados con el propósito de detener el movimiento de enzimas "solubles". Estos incluyen vías de congelación y sección de tejidos, secado instantáneo de las secciones, el uso de estabilizadores colidales inertes para proteger las secciones, e interrupción de la difusión durante la reacción cromogénica.

Fue encontrado por Frost que el plomo en la forma de hidroxilisobutirato de plomo, es suficientemente quelado y no inhibe a la enzima, pero podría ser precipitado, aparentemente como carbonato de plomo, pero con CO_2 en valores de pH neutrales. Este, por consiguiente, podría actuar como el agente precipitante.

Todas las soluciones han sido preparadas en agua libre de CO_2 , cuidando de no introducir otros iones que pudieran competir con éxito contra el hidroxilisobutirato de plomo.

El método provisional, presentado a continuación, parece producir una estimación cuantitativa de la actividad de la ODC en tejidos, mostrando una inhibición con alfa-DFMO, y estimulación por hormonas relevantes en tejidos como respuesta a estas hormonas.

Sin embargo, el método no está terminado porque con los tiempos prolongados de reacción, la localización natural e intracelular de los productos de reacción cambia. Esto podría deberse a la formación de un precipitado complejo conteniendo el bicarbonato de plomo más soluble.

Para todo esto la medición de la actividad total por célula se incrementa linealmente con el tiempo, aparte de la localización del plomo precipitado. El carbonato de plomo es convertido al sulfuro de plomo café-negro el cual es cuantificado por microdensitometría.

Para la preparación del medio de reacción todas las soluciones

requieren de agua libre de CO_2 . Para tres volúmenes de buffer de trietanolamina 0.2M, pH 8.0, conteniendo 40% G04/140 grado de alcohol polivinílico (PVA) se añade un volumen de solución de hidroxibutirato de plomo (17.85% Pb); L-ornitina, 3.4 mg/ml; piridoxal-5'-fosfato 0.62 mg/ml; D.L ditiotreitól. 0.08 mg/ml; L-P-bromotetramizola, 0.15 mg/ml (para inhibir la actividad de la fosfata alcalina). El pH final deberá ser ajustado, si es necesario, a 7.1. Después de incubarse las secciones en este medio de reacción, se requiere un preenjuage para remover la coloración residual, posiblemente causada por fosfatos libres en, o algo similar, las secciones, por el estabilizador. El preenjuage consiste de buffer de trietanolamina 0.2M, pH 8.0, conteniendo 20% G04/140 PVA. El pH final es 7.1. Este medio es puesto dentro de anillos de plexiglas y dejados por 10 minutos a 37°C después de este tiempo este se absorbe y se reemplaza por el medio de reacción (114).

El procedimiento es el siguiente (114):

- 1) Incubar en el medio a 37°C (las secciones cortadas de riñón de rata no tratadas podrían requerir de 10 a 30 minutos).
- 2) Lavar en agua libre de CO_2 .
- 3) Sumergir en una solución acuosa al 0.5% de sulfato de amonio (un minuto).
- 4) Enjuagar en agua destilada.
- 5) Colocar en un medio básico acuoso (por ejemplo el medio Farrant).
- 6) Realizar la medición en un microdensitómetro a 580 nm.

CAPITULO III. AISLAMIENTO Y PURIFICACION

La ODC es una enzima que esta presente en la mayor parte de las células y su actividad se puede inducir por efecto de varias drogas que estimulan el crecimiento así como por la administración de varias hormonas. Esta ventaja se ha utilizado para lograr obtener cantidades que permiten su manipulación lo que a su vez ha posibilitado su aislamiento y purificación de diferentes fuentes.

3.1 PURIFICACION

La combinación de una concentración baja de ODC junto con su inestabilidad, en extractos crudos dificulta su purificación. El uso de reactivos tiol y detergentes no iónicos aumentan su estabilidad, mientras que el descubrimiento de la estimulación máxima de la actividad de la ODC por andrógenos en riñón de ratón ha dado las bases para lograr su reciente purificación.

Janne y Williams-Ashman en 1971 utilizaron la próstata ventral de rata para una purificación de la ODC 300 veces. Comenzando con una ultracentrifugación (actividad específica, 0.03 nmol CO_2 /min/mg de proteína) y utilizando ditiotretol 5mM en todas soluciones, lograron una actividad específica de 0.01 μ moles CO_2 /min/mg de proteína.

El hígado de rata regenerado fue utilizado para una purificación de 175 veces. La ODC fue usada a su vez para inducir anticuerpos en un conejo. Ya que la actividad al principio de la ultracentrifugación fue de 0.02 nmol CO_2 /min/mg de proteína, la actividad específica de la preparación fue solo 0.003 μ mol CO_2 /min/mg de proteína. La ventaja de utilizar los hígados más grandes en lugar de la glándula prostática como fuente de ODC ha sido utilizada y se prefiere inducir la ODC hepática con tioacetamida a realizar una hepatectomía parcial.

Ono et al obtuvieron un citosol con una actividad específica de 0.036 nmol/min/mg de proteína y por el uso de diferentes pasos de precipitación isoelectrica, cromatografía en columna de DEAE-celulosa, filtración en gel y centrifugación por gradiente de densidad, lograron una purificación de 5400 veces (Tabla 3.1).

La ODC obtenida por este procedimiento, cuando se somete a cromatografía de afinidad, da preparaciones con actividades específicas altas (Tabla 3.1)

Fuentes ricas de ODC de mamíferos (~ 1nmol/min/mg de proteína) se encontraron en extractos de ovarios inmaduros de rata estimulados por suero de yegua embarazada y hormona luteinizante o gonadotropina coriónica humana (HGC).

Simultáneamente, las ODCs de tipo bacteriano y fungica comenzaron a purificarse. Las enzimas de *Escherichia coli* (Tabla 3.1), muestran actividades específicas mucho más grandes que las

TABLA 3.1
ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA ODC DE DIFERENTES FUENTES BIOLÓGICAS

FUENTE	ACTIVIDAD ESPECIFICA ($\mu\text{mol de CO}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína)	REFERENCIA
BACTERIAS		
<u>Escherichia coli</u>	130	114
Biosintética	100	114
Biodegradable	0.035	73
	0.009	73
<u>Lactobacillus sp 30a</u>	150-300	114
HONGOS		
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	0.51	41
	0.80	114
	0.70	113
<u>Phycomyces blakesleeana</u>	1.70	100
MAMÍFEROS		
Fígado de rata	0.01	1144
	10000 ^b	13
Hígado de ternera		
Tratado con tiosacetamida	292600 ^b	13
Hígado de rata		
Regeneración	3000 ^b	13
	0.003	114
Tratado con tiosacetamida	193000 ^b	13
	233000 ^b	13
	0.19	114

TABLA 3.1
CONTINUACION

F U E N T E	ACTIVIDAD ESPECIFICA (μmol de CO_2 /min/mg de proteína)	REFERENCIA
MAMIFEROS		
Riñón de rata		
Tratado con tioacetamida	0.24	114
	0.28	114
	0.10	114
	1.04	114
	20-25	116
	1.2-1.5x10 ^{6b}	3
	1.0-1.5 ^c	2
Tratado con tioacetamida + SHM ^d	1.4x10 ^{6b}	3
	1.1x10 ^{6b}	18
	1.1x10 ^{6e}	44
	19	114
Riñón de ratón		
Estimulado con andrógenos	23	114
	30	114
Estimulado con testosterona	1.4 ^b	12

a $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

b $\text{umol}/\text{hr}/\text{mg}$

c unidades/mg

d SHM = ácido hidroximino aminovalérico

e $\text{umol}/\text{hr}/\text{mg}$

correspondientes a mamíferos.

La ODC biosintética de *Escherichia coli* libera $99 \mu\text{mol CO}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína mientras que la ODC biodegradativa alcanza una actividad específica de $130 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

La enzima biodegradativa aparentemente homogénea fue purificada en dos pasos (tratamiento con sulfato de protamina seguida por un fraccionamiento con sulfato de amonio) siendo posible por la actividad específica extremadamente alta ($9.3 \mu\text{mol CO}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) de la solución de sobrenadante de 35000g de *Escherichia coli* induciendo su crecimiento en un medio rico en aminoácidos a un pH bajo.

Una actividad específica igualmente alta de $180 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína fue encontrada para la ODC extraída de *Lactobacillus sp 30a*. Esta purificación comienza de un polvo de acetona de una fracción de sobrenadante de 80g (actividad $10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) de células cultivadas en ornitina para la máxima inducción de ODC. La enzima fue purificada a homogeneidad aparente, visualizada por microscopía electrónica y cristalizada como agujas pequeñas. En contraste a la actividad extremadamente alta de la ODC bacteriana, las ODCs fúngicas purificadas muestran actividades cercanas a las ODCs de mamíferos cuya purificación fue descrita anteriormente.

En 1978 Mitchell et al purificaron la ODC del hongo *Physarum polycephalum* 500 veces, para una actividad específica de $1.7 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

En 1981, una preparación aparentemente homogénea de ODC de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* produjo una actividad específica de $0.5 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína de una actividad al principio en la solución de sobrenadante de 2000g de $0.3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

También en 1981, el hígado de rata tratado con tioacetamida, produjo ODC (actividad específica, $1.04 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) la cual fue estabilizada por la adición del detergente no iónico Tween 80 (0.1%) o glicerol al 50%. Más de un orden de magnitud por arriba de la actividad específica ($19 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) con un 8% de rendimiento fue logrado por Kameji et al quien duplico la actividad específica de su material inicial por el uso del ácido DL-alfa-hidrazino-delta-aminovalérico inhibidor de la ODC y un sexto paso de purificación incluyendo dos exposiciones a heparin-seferosa.

La purificación de rihón de rata inducido con andrógenos en presencia de un detergente no iónico permiten a Persson alcanzar una actividad específica de $23 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, mas alta que cualquier ODC eucariótica. Este procedimiento consta de una precipitación con sulfato de amonio, cromatografía con DEAE celulosa, cromatografía de afinidad en agarosa de piridoxamina-5-

rosfato y cromatografía en gel de exclusión, los pasos posteriores requieren de 0.02% de Brij 35 para la estabilidad.

La actividad específica rebasa la predicha para la ODC de riñón por su enlace con el inhibidor irreversible (^{14}C)-DFMO (114).

3.1.1 PURIFICACION DE LA ODC DE *Escherichia coli*.

Para la purificación de la ODC biosintética de *Escherichia coli* se utiliza una cepa de *E. coli* UW44(ATCC 27549) que crece a una temperatura de 37°C, con aeración, en medio 63 suplementado con elementos traza, 0.2% de glucosa y 0.05% de extracto de levadura. Después de pasar la fase logarítmica ($A_{540}=1.2$) las células son recolectadas, lavadas en cloruro de sodio al 0.9% y almacenadas a -20 °C. El rendimiento celular es generalmente de 150-200 gramos de peso neto de cien litros de cultivo.

Después se realizan los siguientes pasos de purificación determinando la actividad específica en cada uno (Tabla 3.2)(40):

- 1) Extracto crudo
- 2) Precipitación con estreptomycin
- 3) Fraccionamiento con sulfato de amonio
- 4) Tratamiento con calor
- 5) Cromatografía de hidroxipatita
- 6) Filtración en gel sefadex G-200
- 7) Cromatografía en DEAE-sefadex A-25

Se estima que la purificación de un kilogramo de células es cerca del 85%.

En la purificación de la ODC biodegradativa de *E. coli* se incula un litro de medio 63 suplementado con elementos traza, 0.2% de glucosa y 0.05% de extracto de levadura a 37°C con aeración. Esta suspensión inoculada se añade a diez litros de medio inductor (1% de caldo nutritivo, 0.05% de sulfato de amonio, 0.1% de cloruro de sodio, 0.1% de K_2HPO_4 , 0.05% de citrato de sodio y 0.8% de L-ornitina, ajustado a un pH de 5.2) y permite el crecimiento sin aeración por siete horas a 37°C. Las células se lavan con cloruro de sodio al 0.9% y utilizadas inmediatamente para la purificación.

En cada paso de purificación se determina la actividad específica de la enzima. Los pasos a seguir son los siguientes (Tabla 3.2) (40):

- 1) Extracto crudo
- 2) Precipitación con sulfato de protamina
- 3) Fraccionamiento con sulfato de amonio

3.1.2 PURIFICACION DE LA ODC DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Se prepara un medio que contiene 2% de dextrosa, 0.7% de levadura base nitrógeno sin aminoácidos(Difco), 0.005% de adenina y 0.025% de treonina. El pH se ajusta a 7 con K_2HPO_4 . La cepa spe2-4 de *Saccharomyces cerevisiae* crece en este medio en un

TABLA 3.2
PASO DE PURIFICACION Y ACTIVIDAD ESPECIFICA DE DIFERENTES FUENTES BIOLÓGICAS

FUENTE	PASO DE PURIFICACION	FACTOR DE PURIFICACION	ACTIVIDAD ESPECIFICA (unidades de CO ₂ /ml/hg de proteína)	REFERENCIA
BACTERIAS <i>Escherichia coli</i> Sicciotónicas	Suero crudo		0.02 ^a	40
	Solución sobresaturada de sulfato de estreptomicina		0.02 ^b	
	Sulfato de amonio, 30-50.0%		0.02 ^c	
	de saturación		0.15 ^d	
	Creosoleno 0.5 ml/l		2.10 ^e	
	Cromatografía de hidróxido de titanio		5.20 ^f	
	5-100		98	
	5-100		9.3 ^g	
	13.1a		13.1a	
	130 ^h		130 ^h	
Biodegradable	Suero crudo		9.3 ^g	
	Solución sobresaturada de sulfato de proteínas		13.1a	

**TABLA 3.2
CONTINUACION**

FUENTE	PAJO DE PURIFICACION	FACTOR DE P/E	ACTIVIDAD ESPECIFICA	SERVICIO
		REPLICACION	(unidades de CO ₂ /ml/hora de proteasa)	CIA
MONOCES				
Saccharomyces cerevisiae				
Yeast				
	Extracto libra de células	1	0.02b	41
	Sulfato de amonio	2	0.03b	
	Cromatografía en celuloosa			
	DE-32	21	0.43b	
	Cromatografía en sefecril			
	S-200	120	2.50b	
	Cromatografía en feniil-sefazona	1480	31 ^b	
PHYLAEUM POLYSPORIUM				
	Cosecha (de) por precipitacion con acetona	1 ⁰	0.004 ^b	42
	DAM-celuloosa	1.60	0.007a	
	Sefecril S-200	3.10	0.01a	
	DAM-sefecril	9.70	0.04a	
	Ultrasol Am-24	380.0a	1.40a	
	Microfiltrata	820.0a	3.20a	
		3000.0a	12.50a	

TABLA 3.2
CONTINUACION

FUENTE	MODO DE PURIFICACION	FACTOR DE FI APLICACION	ACTIVIDAD ESPECIFICA ($\mu\text{mol de CO}_2/\text{min/mg}$ de proteina)	RESERVA CZA	
MAMIFEROS					
Hígado de rata Tratado con tiotremida	Extracto crudo	1	3.13	44	
	DMG-soluciona	10	31.04		
	PMG-braso-safarosa	3600	11000.04		
	Prigera heparin-safarosa	36000	120000.04		
	PMG-safarosa	360000	1200000.04		
	Segunda heparin-safarosa	360000	1100000.04		
	Extracto crudo	1	3.13		13
	DMG-soluciona	10	30.704		
	PMG-braso-safarosa	3.6x10 ⁴	1.13x10 ⁵		
	Hepazin-safarosa	3.6x10 ⁴	1.20x10 ⁵		
PMG-safarosa	3.6x10 ⁵	1.20x10 ⁶			
Segunda heparin-safarosa	3.6x10 ⁵	1.10x10 ⁶			
Substrato			0.84	116	
DMG-soluciona eluida			31.404		
Azulinas en gel eluida			2890.004		

TABLE 3.2
CONTINUATION

POINTS	PHASE OF PURIFICATION	FACTOR OF FI DIFFUSION	ACTIVIDAD ESPECIFICA ($\mu\text{mol de Coz/min/mg}$ de proteínas)	APPROX CIA
MADRID línea de ratón	Sobrecamante 20000	1.0	0.61h	3
	Tratamiento seguido de 4.6	2.5	2.59h	
	Superficie cañón 0-150	12.3	9.41h	
	DMR-cañón	282.0	89.80h	
	Cromatografía de afinidad	2864.0	1389.00h	
Tratado con tox corticoides	Sobrecamante 20000	1.0	278.00	14
	Tratamiento seguido de 4.6	2.6	726.00	
	Superficie cañón 0-150	10.8	2016.00	
	DMR-cañón	284.0	7310.00	
	Cromatografía de afinidad	2864.0	71426.00	
Estimado con corticoides	Sobrecamante	1	140h	43
	Diluido con sulfato de ammonio precipitado	2	27h	
	DMR-cañón etílico	9	130h	
	Superficie cañón 0-150	2670	28400h	
	Filtración en gel	10400	149000h	

TABLE 3.2
CONTINUATION

FUENTE	PASE DE PURIFICACION	FACTOR DE PL BIFILICACION	ACTIVIDAD ENZIMATICA (μ mol de CO ₂ /min/mg de proteina)	REFERENCIA
MIXTURAS				
Méjido de ternera				
Tratado con tiol acetato		418	12d	13
	Sopresadante 30000g	219	3273	
	Disulfiram 44	219	3273	
	Microministria	219	3273	
	Electroforesis Tris-	9756	9756d	
	Barbital	9756	11702d	
	Covalente tiol	3439c	29260d	

a unidades/mg

b mol/hr/mg

c purificación relative

d μ mol/min/mg

e PMS= fosfato de piridoxamina

f μ mol/hr/mg

fermentador de cien litros a 28°C con aeración vigorosa. Las células son recogidas a 4650nm de ~5.0.

En cada paso de purificación se determina la actividad específica. Los pasos son los siguientes (Tabla 3.2) (41, 112) Trescientos gramos de células son suspendidos en tres volúmenes de Tris-HCl 0.025M, pH 7.6, conteniendo ditiotritol 5mM, MgCl 1mM y EDTA 0.1mM y se provoca su ruptura a 18000 psi. La suspensión resultante es centrifugada por treinta minutos a 20000g.

- 1) Fraccionamiento con sulfato de amonio.
- 2) Cromatografía DE-52
- 3) Cromatografía en sefacril S-200
- 4) Cromatografía en fenil-sefaroza.

3.1.3 PURIFICACION DE ODC DE *Physarum polycephalum*.

Se ha utilizado *Physarum polycephalum*, sublínea MSC(VIII), inoculado en lotes de quince litros en un fermentador de veintiocho litros. El medio se inocula con trescientos mililitros de cultivos de microplasmodia en la fase logarítmica permitiendo su crecimiento por cuatro días a 28°C con agitación constante a cien rpm y aeración de cuatro litros por minuto.

La microplasmodia resultante se removio del medio de cultivo por centrifugación a 400 g por 60 segundos y lavadas con NaCl 40mM. El material de lavado se homogeniza después en acetona a 0 °C seguido por centrifugación a 600 g por cinco minutos.

Los pasos de purificación son los siguientes (Tabla 3.2)(42):

1) Las células precipitadas con acetona conteniendo 2.5g de proteína fueron suspendidas en cinco litros de fosfato de potasio frío 0.05M (pH 7.4) conteniendo Na₂ EDTA 0.5 mM, 2-mercaptoetanol 15 mM, fosfato de piridoxal 20 μM y NaN₃ al 0.12% (p/v). El material insoluble fue centrifugado por cinco minutos a 300 g. La suspensión de enzima resultante fue filtrada.

- 2) DEAE-celulosa
- 3) Sefacril S-300
- 4) DEAE-Sefacel
- 5) Ultragel AcA-34
- 6) Hidroxiapatita

3.1.4 PURIFICACION DE LA ODC DE HIGADO DE TERNERA TRATADO CON TIACETAMIDA

Todos los pasos de purificación se llevaron acabo a 4 °C. El hígado (~800-12000 g de peso neto) estimulado con tioacetamida fue homogeneizado en dos volúmenes de buffer de purificación conteniendo ditiotritol 0.5 mM, EDTA 0.1 mM y fluoruro de fenilmetanosulfonil 1 mM en cuatro lotes. Las cubas libres del buffer se incluyeron en la ruptura del tejido para mantener una temperatura baja. El homogeneizado fue centrifugado a 4000 g por 30 minutos y el sobrenadante fue filtrado (13).

Los pasos de purificación son (Tabla 3.2) (13):

- 1) Cromatografía de intercambio iónico utilizando DEAE-Sefacel.
- 2) Cromatografía en Ultrogel HCA 44
- 3) Cromatografía en hidroxapatita
- 4) Electroforesis en gel
- 5) Cromatografía de grupos tiol covalentemente unidos

3.1.5 PURIFICACION DE LA ODC DE HIGADO DE RATA TRATADO CON TIOACETAMIDA

Los pasos de purificación son los siguientes (Tabla 3.2) (15, 44):

1) Extracto crudo. El hígado se homogeneiza con dos volúmenes de sacarosa 0,2M, buffer Tris-HCl 25 mM, ditioneitol 1mM y EDTA (pH 7.5) 0.1 mM. La mezcla homogénea se centrifuga a 15000 g por 15 minutos y el sobrenadante se recentrifuga a 10700 g por una hora.

- 2) Cromatografía en DEAE-celulosa
- 3) Piridoxamina fosfato-dipropiltriamina-sefarosa
- 4) Heparina-sefarosa
- 5) Piridoxamina fosfato-sefarosa
- 6) Segunda Heparina-sefarosa

3.1.6 PURIFICACION DE ODC DE RIÑÓN DE RATÓN

El riñón de ratón tratado con testosterona es purificado mediante el siguiente procedimiento (2, 14) (Tabla 3.2):

- 1) Precipitación ácida
- 2) Filtración en gel Sefadex G 150 Superfino
- 3) Cromatografía de intercambio iónico usando DEAE-Sefadex A-50
- 4) Cromatografía de afinidad en piridoxamina 5' fosfato unida a gel de agarosa activado

El riñón de ratón estimulado con propionato de testosterona es purificado mediante el siguiente procedimiento (45) (Tabla 3.2):

- 1) Inducción de la enzima y la preparación de extractos
- 2) Fraccionamiento con sulfato de amonio
- 3) Cromatografía en DEAE-celulosa
- 4) Cromatografía de afinidad en agarosa de piridoxamina 5' fosfato
- 5) Filtración en gel

3.2 ESTIMACION DE LA PUREZA

La enzima purificada es ensayada para estimar su pureza por los siguientes métodos (15, 44):

- 1) Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida
- 2) Técnica de doble difusión de Ouchterlony

3.2.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Alicuotas de la ODC purificada de *Physarum polycephalum* (5-10 g de proteína) se dializaron exhaustivamente contra agua destilada a 4°C. liofilizadas y eventualmente suspendidas en 100 de buffer SDS (dodecil sulfato de sodio) (Tris 62.5 mM, pH 6.8, 1% de 2-mercaptoetanol, 0.5% de SDS y sacarosa 0.25M). Estas muestras junto con estándares de peso molecular apropiado fueron sometidas a electroforesis en bloques terminales de geles de acrilamida al 100% a 30 mA y eventualmente teñidos con azul brillante R-250. El material teñido aparece como una banda sencilla a un Mr de 52000; sin embargo aparecen bandas claras a un Mr de 48000, 68000 y en la región de 85000 (42).

La pureza de la ODC de hígado de rata tratado con tioacetamida por electroforesis en gel de poliacrilamida en ausencia y en presencia de SDS (44).

La ODC purificada a homogeneidad aparente de hígado de rata tratado con tioacetamida fue sometida a una electroforesis en gel de poliacrilamida y teñida después con azul brillante. La absorbancia de la banda de la enzima se compara con las bandas de albúmina sérica.

La ODC analizada por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, da una sola banda de Mr 50000 (Figura 3.1). (cerca de 1 µg de la enzima purificada incubada con DL(¹⁴C)DFMD 5 µM a 37°C por 60 minutos). Más del 99% de la actividad de la enzima fue inactivada por este procedimiento. Después de la incubación, la enzima se mete directamente a la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Como se muestra en la figura 3.1, la radioactividad migra con un pico único que coincide con la banda de proteína de Mr 50000 (3).

La enzima fue purificada casi a homogeneidad por los criterios siguientes (15):

- 1) La enzima da una sola banda cuando se prueba por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Figura 3.2). Aunque unas bandas débiles de contaminantes pueden observarse con un análisis cuidadoso. La cantidad total de las mismas se calcula en menos del 3% por un densitograma del gel.

- 2) La enzima da una sola banda de proteína cuando se prueba por electroforesis en gel de poliacrilamida sin SDS a varias concentraciones del gel, y el pico de la actividad de la enzima coincide con la banda de proteína (Figura 3.3).

La electroforesis en disco de gel de la enzima purificada de riñón de ratón tratado con testosterona revela una banda simple de proteína (14).

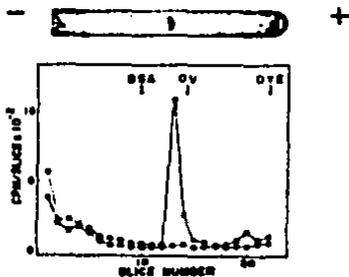


Fig. 3.1 Separación de la QDC en un sistema de poliacrilamida-SDE, la QDC fue previamente separada por cromatografía de afinidad utilizando (^{14}C) DFND (3).

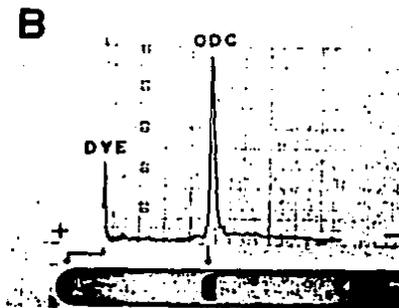


Fig. 3.2 Patrón densitométrico de la ODC separada por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (1.5 g de proteína) (15).

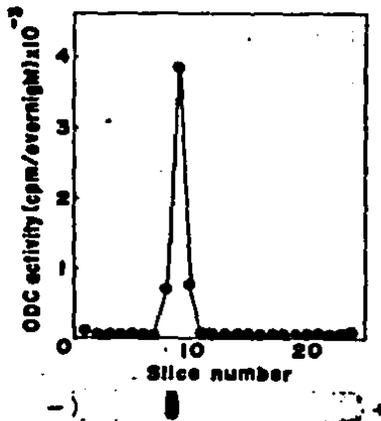


Fig. 3.3 Actividad de la ODC purificada por electroforesis en gel de poliacrilamida (15).

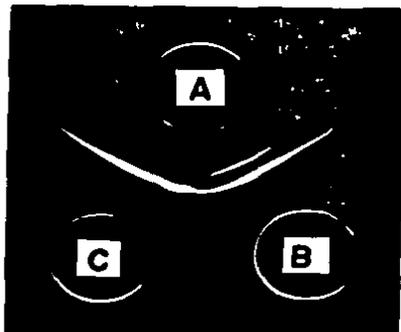


Fig. 3.4 Bandas de precipitacion de la ODC obtenidas por la tecnica de inmunodifusion de Ouchterlony (15).

3.2.2 TECNICA DE DOBLE DIFUSION DE OUCHTERLONY

La ODC de hígado de rata tratado con tioacetamida se somete a un análisis de inmunodifusión doble de Ouchterlony para estimar su pureza (44).

La ODC de hígado de rata tratado con tioacetamida fue analizada por el método de doble difusión de Ouchterlony usando un antisuero de conejo contra las preparaciones de la enzima parcialmente purificada, la enzima purificada da una banda de precipitación. Una enzima parcialmente purificada de 25% de pureza da dos líneas de precipitación, una de las cuales se fusiona completamente con la que se obtiene por la enzima purificada (15) (Figura 3.3).

La ODC de riñón de ratón fue purificada homogeneidad aparente. Los anticuerpos para la ODC se producen en un conejo usando la enzima purificada. Utilizando la técnica de doble difusión de Ouchterlony se revela una línea simple de precipitación entre el antisuero y la ODC purificada de riñón de ratón (Figura 3.4).

3.3 ACTIVIDAD ESPECIFICA Y SU DETERMINACION

La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (41, 44, 88). Constituye una medida de la pureza de la enzima, que aumenta durante el proceso de purificación, y llega a ser máxima y constante cuando esta se halla en estado puro (88).

Recientemente Pritchard et al estudiaron la inactivación de la ODC de hígado de rata tratado con tioacetamida por incubación con (5-¹⁴C)-alfa-DFMO como resultado de un enlace covalente radioactivo con la enzima. La extensión del enlace correlaciona con el grado de inactivación y con la cantidad de enzima presente. La estequiometría obligada de la (5-¹⁴C)-alfa-DFMO por tanto provee un método conveniente para la cuantificación de la ODC y la determinación de la pureza de las preparaciones de la enzima (116) así como la estimación de la actividad específica de la enzima purificada (2).

Suponiendo que una molécula de la droga es necesaria para inactivar cada subunidad de la enzima podría calcularse una actividad específica para la ODC de hígado de rata de cerca de 20 a 25 $\mu\text{mol CO}_2/\text{mg}/\text{min}$ bajo las condiciones estándar ensayadas (116) o 1.2-1.5 $\times 10^6$ nmol $\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg}$ de proteína (3) o 1.0 a 1.5 mmol/h/mg (2).

Este valor sustancialmente más grande que el reportado por cualquier grupo que tiene ODC purificada de mamíferos. Esta

discrepancia podria ser considerada por la inestabilidad de la ODC o que las preparaciones finales pudieran contaminarse con ODC inactiva.

La actividad especifica predicha para la ODC purificada de mamiferos por Pritchard et al es completamente compatible con las preparaciones homogeneas equivalentes de ODC bacterianas las cuales liberan cerca de 30 $\mu\text{mol CO}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteina (116).

La ODC nativa de higado de rata tratado con tioacetamida tendria una actividad especifica de cerca de 1.4×10^6 unidades por mg de proteina, el cual concuerda bien con el valor predicho por Pritchard et al (3).

La actividad especifica determinada para la ODC purificada de higado de ternera tratado con tioacetamida es comparable a los reportados para las enzimas purificadas de higado de rata tratado con tioacetamida, 250000 pmol/min/mg.

Sin embargo, esta es casi 100 veces mas grande que la obtenida con la enzima purificada de higado de rata regenerado (13) (Tabla 3.1).

La actividad especifica de la ODC pura de higado de rata, reportada por Pritchard et al, concuerda con la actividad especifica de la ODC purificada de riñon de raton tratado con testosterona (2, 12) (Tabla 3.1).

La actividad especifica de la ODC purificada de riñon de raton tratado con testosterona es la mas alta jamas reportada para la ODC purificada. La purificacion de ODC de virus de simio SV40T, fibroblastos de raton 3T3 y de higado de rata resulta en enzimas con una actividad especifica 7 y 50 veces respectivamente.

Estas variaciones en la actividad especifica son mas probables no debido a diferencias en el grado de purificacion puesto que la electroforesis en gel revela una sola banda de la proteina (14).

CAPITULO IV. PROPIEDADES DE LA ORNITINA DESCARBOXILASA

Varios autores han realizado estudios de la ODC en células eucariotes y procariones determinando sus propiedades fisicoquímicas.

4.1 COFACTORES

Además de la naturaleza proteica, que confiere a las enzimas una estructura tridimensional, la mayoría de ellas requiere alguna o algunas moléculas no proteicas para su función catalítica. La nomenclatura de estas moléculas ha sido confusa, utilizando diversas denominaciones tales como: grupo prostético, cofactor o coenzima (92). El cofactor puede ser un ion metálico, o bien una molécula orgánica llamada coenzima; algunas enzimas necesitan de ambos. Los cofactores son generalmente estables frente al calor, mientras que muchas proteínas enzimáticas pierden la actividad por calefacción. Algunas enzimas requieren cofactores tan pequeños como el ion cloruro (88).

Los cofactores actúan generalmente por uno de los siguientes mecanismos (92):

- 1) El cofactor de manera aislada, es capaz de catalizar una reacción, sin embargo en presencia de la enzima aumenta su capacidad catalítica y adquiere especificidad por el sustrato.
- 2) Puede formar un complejo con el sustrato y el sitio activo de la enzima permitiendo la catálisis.
- 3) Suele funcionar como un potente atractor de electrones en algun punto del ciclo catalítico.

La sensibilidad de la ODC de hígado de ternera al EDTA y el efecto de una variedad de quelantes metálicos que inhiben a la enzima sugirió la posibilidad de que se requiere un enlace metal-enzima para la preservación de su actividad catalítica.

Estos estudios han sido realizados utilizando diferentes agentes complejantes, los cuales permiten conocer los requerimientos de la especificidad total de una metaloenzima en particular. La enzima semipurificada se incubó con concentraciones crecientes de varios quelantes (13) (Figura 4.1).

Todos los quelantes exhiben alguna habilidad para inhibir la enzima. El más potente es la 1, 10 fenantrolina, un quelante de transición del grupo de metales 11B. Puesto que la 1, 10 fenantrolina es una molécula plana, es posible que ésta se inserte dentro de las áreas hidrofóbicas de las proteínas y altere su actividad enzimática.

Por su estructura similar a la 1, 10 fenantrolina, pero sin ser un análogo quelante, la 4, 7 fenantrolina ha permitido confirmar la

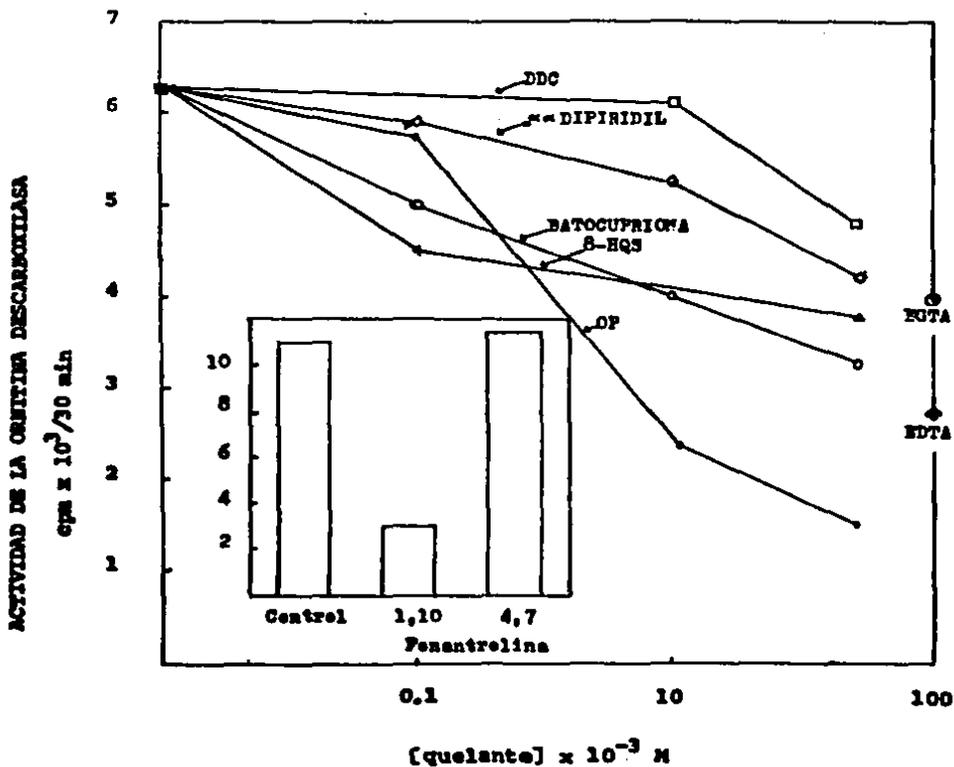


Fig. 4.1 Inhibición de la actividad de la ODC de hígado de ternera por agentes quelantes (13).

suposición de que un metal está involucrado con la enzima ya que éste análogo posee todos los atributos de la 1,10 fenantrolina excepto la habilidad para formar un complejo de coordinación con los metales. La potencia de este quelante metálico de transición que exhibe una leve afinidad por los metales alcalinotérreos, comparada con la relativa ineficacia del EDTA quelante de amplio espectro, sugiere que un elemento de las series de transición está involucrado en la conservación de la actividad de la ODC.

La 4, 7 fenantrolina no tiene efecto sobre la actividad de la ODC lo que sugiere que el quelante metálico no fue inhibido debido a las propiedades aromáticas de su estructura (Figura 4.1).

Varios iones metálicos han sido probados por su habilidad para reaccionar con la ODC inhibida con la 1, 10 fenantrolina, tales como: Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{+} , Ni^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} , los cuales fueron incapaces de restaurar la actividad enzimática además de que todos los metales excepto el Mn^{2+} , inhibieron la enzima no tratada (Tabla 4.2).

La inhabilidad para regenerar la actividad enzimática por la adición de metales sugiere que los quelantes remueven el metal constituyente antes que formar un complejo mixto in situ con la apoenzima. La remoción del metal podría entonces derivar en cambios irreversibles en la molécula de enzima (13).

4.2 COENZIMAS

El término coenzimas se aplica a moléculas orgánicas, las cuales son derivadas de vitaminas y generalmente tienen un tamaño molecular mayor que los cofactores.

La unión del cofactor a la enzima es reversible en la mayoría de los casos, pero en otros se establece un enlace covalente.

Las características de las coenzimas son las siguientes:

a) Son termoestables. Mantienen su estructura química a temperaturas en que las proteínas se desnaturalizan.

b) En general, son derivados de vitaminas.

c) Diversas enzimas que realizan la misma actividad catalítica, utilizan la misma coenzima; nicotinamida-adenin-dinucleótido (NAD), que participa en varias reacciones de deshidrogenación.

d) En algunos casos funcionan como co-sustratos, ya que son modificados durante una reacción catalítica, retornando a su forma original en otra reacción (Piridoxal-piridoxamina) (92).

Se han realizado estudios para determinar la coenzima de la ODC.

En *Physarum polycephalum* se demostró que la reacción de descarboxilación de la ornitina para producir putrescina es dependiente de la coenzima fosfato de piridoxal (PLP) como se ilustra en la gráfica de doble recíproca de la figura 4.2 (37).

Como se muestra en la tabla de la ODC purificada de *Physarum* (Tabla 4.1) es muy sensible a reactivos disulfuros y tioles específicos. En la ausencia de estos agentes, o en la presencia de agentes reductores tales como ditiotreitól, 2 mercaptoetanol y glutatión reducido, esta enzima es muy estable a 30°C. Por lo tanto, parece que la ODC de *Physarum* contiene un grupo tiol crítico que está suficientemente expuesto a una fácil oxidación y la formación de disulfuro o la formación de otro derivado (Tabla 4.1).

En la tabla 4.1 aparece que este grupo tiol esencial está en el sitio activo de la enzima o cercano a él. La inactivación de la enzima, por formación de una mezcla de disulfuro con glutatión, es bloqueada por la presencia de cantidades micromolares de la coenzima, fosfato de piridoxal. Los análogos de la coenzima fosfato de piridoxal son completamente ineficaces en la protección del grupo tiol, mientras que el fosfato de piridoxamina es más efectivo a altas concentraciones, pero ninguno de estos análogos son catalíticamente activos (21).

Varios estudios han reportado la existencia de una forma dimerica de la ODC. Algunos trabajos han sugerido que la forma dimerica de la enzima es inactiva.

Sin embargo, el dímero inactivo se obtiene por remoción del reductor, sugiriendo que los tioles libres esenciales para la actividad catalítica podrían estar complejados dentro de los puentes disulfuro intermoleculares (13).

En riñón de ratón se observa que la ODC requiere de fosfato de piridoxal para su actividad (45).

La secuencia de aminoácidos de la ODC de riñón de ratón se ha deducido de la secuencia de nucleótidos del cDNA. La enzima consiste de 461 aminoácidos. La secuencia contiene 12 residuos de cisteína los cuales podrían cuantificarse por el requerimiento estricto de altas concentraciones de agentes tiol reductores para mantener la actividad enzimática.

También contiene 19 residuos de arginina y 29 de lisina, pero sólo hay tres pares de aminoácidos básicos adyacentes los cuales podrían tener una importancia particular en la división proteolítica.

La localización del sitio activo no está completamente establecida pero la reacción de la enzima con (3H)DFMO sugiere que la DFMO se enlaza a un residuo de lisina en la posición 298. Esta lisina ocurre en la secuencia Val-Trp-Lys-Glu-Gln-Pro-Gly-Ser (residuos 296-303), los cuales tienen ciertas similitudes a la secuencia Val-His-Lys-Gln-Gln-Ala-Gly-Gln la cual se conoce como el sitio activo de la ODC biodegradativa de *Escherichia coli*. Excepto para los primeros cuarenta residuos, la tercera parte de la N terminal de la ODC de riñón de ratón contiene

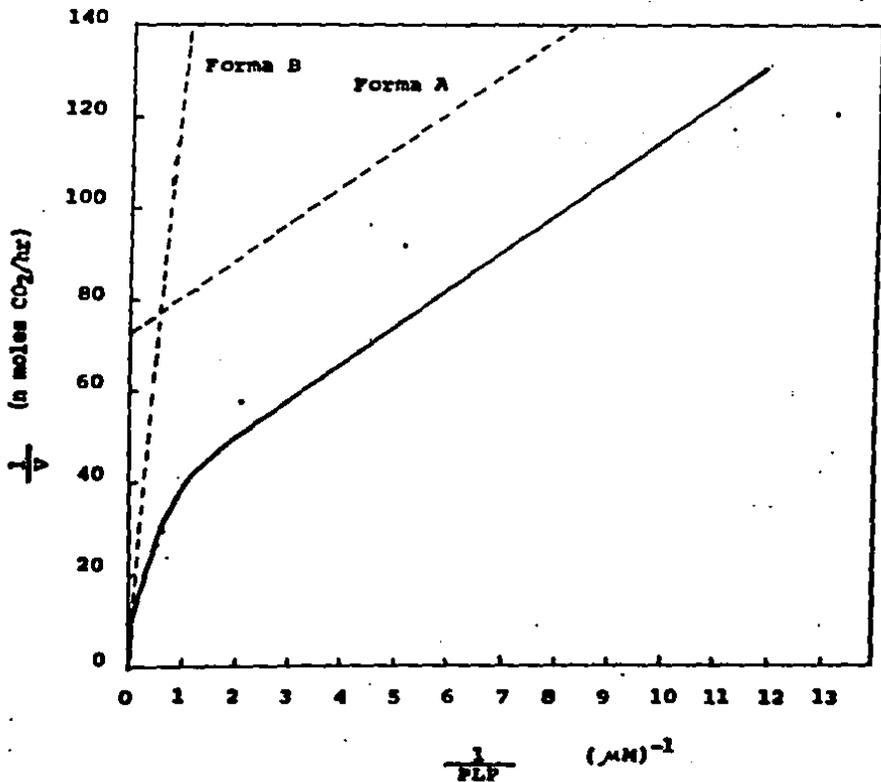


Fig. 4.2 Doble recíproca no lineal de la activación de la QDC por su coenzima (PLP) de un extracto homogéneo de *Physarum* (37).

GRÁFICA 4.1

REACTIVO	CONCENTRACION (μM)	ACTIVIDAD TOTAL RESERVADOS DES- PUES DE 15 MIN A 30°C (N DE AG- TIVIDAD INICIAL)
CONTROL	-	21
FOSFATO DE PIRIDOXAL	0.5	37
	1.0	51
	50.0	88
FOSFATO DE PIRIDOXAMINA	5.0	29
	25.0	47
	100.0	61
PIRIDOXAMINA PRINCIPAL	100.0	19
	50.0	30

(31)

predominantemente grupos hidrofóbicos y la mayoría de los grupos hidrofílicos en la otra tercera parte en el carbono terminal. La lisina 298 está en una región justamente después de esta transición la cual corresponde a la región más hidrofílica (7).

La idea general del mecanismo por el cual la DFMO lleva a la disminución de la actividad de la ODC es clara, pero en la naturaleza exacta de las especies alcalinas, se desconoce el sitio de ataque sobre la proteína para inactivarla.

El aminoácido aceptor más probable de las especies activadas por la DFMO es la lisina (100).

Recientemente Mitchell y Calderera, indican que la ODC requiere la presencia de compuestos tiol o agentes tioles reducidos a fin de alcanzar su actividad máxima (97).

De acuerdo a Friedman et al y Ono et al, la ODC purificada de hígado de rata requiere grupos tiol para su actividad máxima.

La importancia de grupos tiol en la actividad de la ODC fue demostrada con éxito por Obenrader y Prouty en ODC hepática purificada por cromatografía de afinidad usando seferosa activa (108).

En *Saccharomyces cerevisiae*, la enzima requiere de fosfato de piridoxal para su actividad y es específica para la ornitina. La enzima es inactiva en la ausencia de tioles y podría ser activada por los mismos. Entre los compuestos tiol el más efectivo es el ditiotreitól (41) (Tabla 4.2).

En *Escherichia coli* la ODC biodegradativa (dODC) y la ODC biosintética (bODC) requieren de fosfato de piridoxal para su actividad uniéndose una molécula de coenzima por subunidad (40) (Tabla 4.2).

El *Clostridium thermohydrodulfuricum* también requiere de fosfato de piridoxal y ditiotreitól para su actividad (93) (Tabla 4.2).

4.3 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA ODC DE DIFERENTES FUENTES

En la tabla 4.2 se resumen las propiedades fisicoquímicas de la ODC de diferentes fuentes.

4.3.1. PESO MOLECULAR Y SUBUNIDADES

Las enzimas biosintética y degradativa de *Escherichia coli* son dímeros pero difieren en su peso molecular, la enzima biosintética, $M_r=82000$ es 2000 daltones más pesada que la ODC biodegradativa.

La ODC de *Lactobacillus* tiene aproximadamente el mismo peso molecular, $M_r=85000$, pero existe como un duodécimero.

TABLA 4.2
 PROPORCIONES FISICOCUANTICAS DE LA COC DE DIFERENTES FUENTES BIOLÓGICAS

F U N T E	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (unidades/ml/mg de proteína)	CONCENTRACION COMUNAL	PARA PARA PROM (ml)	PARA PROM (µM)	PM PROM	PM PROM	pl ¹
BACTERIAS							
<i>Escherichia coli</i>		PLph	3.6				5.9 7.0 6.9 6.9
<u>Biodegradable</u>	130	PLph	36.0	80000			
		PLph	3.6	80000-			
	0.009	PLph		83000			5.3
<u>Miosintéticas</u>	100	PLph	5.6	1.0	83000		8.1
		PLph	3.6	1.0	80000-		8.1
	0.035	PLph	5.6		83000		8.2 7.5 8.23
			5.6±0.48				
<u>ilestridium</u>		PLph y					7.5
<u>Hydrogysotomus</u>		Dpph					
<u>Lactobacillus sp 30a</u>	130-200		17.0	0.058	83000		5.6 4.35

Tabla 4.2
CONTINUACION

F U N T O	SUBSTANCIAS POR MOLECU- LA	PESO MOLECULAR DE SUBSTANCIAS	RADIO DE SPINOS	RADIO DE S. DE HUMIDA DES	TEMPERATURA OPTIMA (°C)	TIEMPO DE VIDA MEDIA (min)	REFEREN- CIA
	LACTAZAS						
	<i>Escherichia coli</i>						
	Biodegradable	2	80000				40 56 114 80
		2					75
	Biostintore	2	81000				114 80
							40 75 56 80
	<i>Yeastidium thermophilum</i>				35		95
	<i>actinobacillus sp. 15a</i>	17					114

TABLA 4.2
 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA ODC DE DIFERENTES FUENTES BIOLÓGICAS

F U N T E	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ($\mu\text{mol de O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína)	CONCENTRACION	COMBINACION	MS PARA ODC MÍNIMA (μM)	MS PARA PLP ^h (μM)	P ₅₀ ^h	pH OP- TIMO	pI
BACTERIAS								
<i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i>	0.33	PLP ^h		0.091	0.6	60000 70000 80000 60000	8.0 8.0 8.0	
<i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i>	0.20 0.70					70000		
FUNGOS								
<i>Aspergillus</i> <i>terreus</i>	1.70	PLP ^h				80000 80000	7.8 5.5	
<i>Penicillium</i> <i>polysporium</i>		PLP ^h		0.08	0.13 0.05	80000	5.5	
FOUNTS		PLP ^h		0.09	25.00 12.00	80000	5.9 5.9	
<i>Blattodegella</i> <i>maritima</i>	2.63			0.8-0.81			7.8	

TABLE 4.2
CONTINUATION

FORMULA	STRUCTURE FOR MOLECULAR WEIGHT	PERCENT MOLECULAR WEIGHT	RATIO OF STRENGTH	RATIO OF STRENGTH OF SUBSTANCE	TEMPERATURE OPTIMUM (°C)	TIME OF VIBRATION (min)	REFERENCE
ACETYLCHOLINE							41
ACETYLCHOLINE							100
ACETYLCHOLINE							312
ACETYLCHOLINE							100
ACETYLCHOLINE							63
ACETYLCHOLINE						10-10	100
ACETYLCHOLINE							21
ACETYLCHOLINE							42
ACETYLCHOLINE						10-10	21
ACETYLCHOLINE							42
ACETYLCHOLINE							89

Tabla 4.2
 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LA ODC DE DIFERENTES FUENTES BIOLÓGICAS

F U E N T E	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (μ mol de CP/min/mg de proteína)	CONCENTRACION EN PARA ODC MUYA (MAY)	CONCENTRACION EN PARA ODC MUYA (MAY)	PERCENTAJE DE ODC TIPO	PI
AMARILLO					
Alfalfa de terreno tratada con tiametolamida	32240 ^a 5.01 10000	7.5 ^b	0.16 0.10 0.10	2.8 100000	7.0 7.0
Proletas de rata					
Alfalfa de terreno tratada con androgénos	23 50		0.075	0.3 33000	
Setivélido con propionato de calcetoturnos		7.5 ^b		100000	
Setivélido con calcetoturnos	1.4 ^b				

TABLA 4.3
continuación

P	V	B	T	B	SUBSTRATOS POR MOLÉCU- LA	PEMO MOLECULAR DE SUBSTRATOS	RADIO DE STOKES	RADIO DE S. DE SUBSTRATOS DMS	TEMPERATURA CRÍTICA (°C)	TIEMPO DE SEPARA- CIÓN (min)	CI
PAIPEZOS											
					2	24000	4.5	3.14		33	
										116	
							3.07			33	
					2					7	
					3					114	
					2	33000				45	
					3	33000				100	
										19	

PROBLEMAS FISICOCUANTITATIVOS DE LA OCE DE DIFERENTES FUENTES BIOLÓGICAS

Tabla 4.3

P U N T O	ACTIVIDAD BIOLÓGICA (nivel de CFC, g/L/mg de proteína)	CONCENTRACION	DE PARA OX NITRINA (M)	DE PARA PLA (M)	DE OX- TINA	pl
REACTIVOS						
Número de rata	1000 ⁰			44000	7.7	
Regeneración	0.003			44000 ⁰		
Tratado con tiarantamida	191000 ⁰ 233000 ⁰		0.3 0.13	100000	7.0	
		72.4 ⁰	2x10 ⁻⁴	100000	7.0	
		0.15	0.2	43000	7.0	
		0.24	0.13	30000	7.48	
		0.28		30000		
		0.20		30000		
		1.04	0.09	30000		4.9
Tratado con tiarantamida *	1.4x10 ⁰ 1.1x10 ⁰ 1.3x10 ⁰ 2 ⁰			55000 103000 103000 50000		

Entre los eucariotes, la ODC de *Physarum* tiene aproximadamente el mismo peso molecular que la ODC bacteriana, 70000 u 80000, y es también un dímero. La enzima de levadura es un monómero. Su peso molecular en extractos crudos muestra que es de 56000 y de 58000 para la enzima previamente purificada.

Las enzimas de mamíferos tienen un peso molecular entre 48000 y 105000 (108, 114).

4.3.2 PUNTO ISOELECTRICO Y pH OPTIMO

La ODC (Tabla 4.2) es una proteína ácida; pI determinados se encuentran en un rango entre 4 a aproximadamente 4.8 (108, 114).

El pH óptimo para la actividad de la ODC se distingue rápidamente de las enzimas bacterianas, las cuales han sido purificadas (Tabla 4.2), de la ODC de mamíferos.

La ODC biosintética de *Escherichia coli* tiene un pH óptimo entre 8.1 y 8.3, una unidad más grande que la ODC biodegradativa. La ODC de *Lactobacillus* tiene una actividad óptima bajo condiciones ácidas (pH 5.8) (114). El *Clostridium* tiene un pH óptimo de 7.5 (95) (Tabla 4.2).

La ODC de levadura y hongo muestran un pH óptimo similar (8.0 y 7.8 respectivamente) a los valores (7.0-7.7) para la ODC de mamíferos).

La ODC de hígado de rata cambia su pH óptimo bajo purificación desde 7.0 a 7.8 cuando se ensaya en presencia de fosfato de sodio (114).

4.3.3 VALORES DE K_m , V_{max} Y SUSTRATO ESPECIFICO

Las enzimas bacterianas se distinguen también de la ODC de eucariotes por sus altos valores de K_m para la ornitina, 1.7 a 56 mM comparando con 0.03 a 0.2. Todas las ornitinas descarboxilasas tienen una alta afinidad por su cofactor fosfato de piridoxal, con valores de K_m entre 0.06 y 33 μ M (114) (Tabla 4.2).

La dependencia de la actividad de la ODC biosintética de *Escherichia coli* sobre la concentración de ornitina muestra la cinética clásica de Michaelis-Menten. Cuando estos datos fueron graficados como V contra V/S , y los puntos resultantes fueron ajustados por el método de mínimos cuadrados se obtiene una K_m para la ornitina de 5.6 mM (Tabla 4.2).

En la presencia de cualquier poliamina, la K_m aparente se incrementa mientras que la V_{max} no tiene un cambio significativo (Tabla 4.2) sugiriendo una competición simple de la ODC con el sustrato (80).

La afinidad aparente de la ODC purificada de hígado de ternera por la ornitina a 37°C se calculó probando la enzima con varias concentraciones de sustrato y fosfato de piridoxal 0.06 μ M. La enzima exhibe la cinética de Michaelis-Menten, dando una doble recíproca, la cual indica una K_m para la ornitina de 0.16 mM. La enzima también presenta afinidad por el fosfato de piridoxal; la K_m de la ODC por el cofactor fue de 2.5 μ M cuando se mide en presencia de ornitina 1 mM (13).

La ODC de *Saccharomyces cerevisiae* sigue la cinética de Michaelis-Menten en un rango de pH de 6.5 a 9.0 con una V_{max} a pH 8.0 (41).

CAPITULO V. REGULACION

La ODC se encuentra en niveles bajos en las células en estados fisiológicos de latencia. Su actividad puede elevarse varias veces como respuesta a diversos estímulos tróficos tales como hormonas, drogas, regeneración de tejidos y factores que estimulan el crecimiento celular en varias clases de tejido (4, 10).

Al mismo tiempo, si cesan las condiciones que favorecen este crecimiento y con la presencia de inhibidores de proteínas o de la síntesis de RNA, se observa un decremento en la actividad de la ODC (26).

Existen varios tipos de regulación de la actividad de la ODC (22, 26, 36, 43, 55, 77, 81, 109):

- 1) Control a nivel de la síntesis de RNA.
- 2) Control traducional por poliaminas.
- 3) Inducción de una antienzima o su liberación por poliaminas y su inhibidor.
- 4) Transiciones entre una forma activa y una menos activa (isoenzimas o formas múltiples).
- 5) Regulación por hormonas.
- 6) Estimulación e inhibición de la actividad de la ODC por varios nucleótidos de guanina.
- 7) Control osmótico de la ODC por cationes monovalentes.
- 8) Regulación de la ODC a nivel molecular.

Para los cambios en la actividad de la ODC se han propuesto varios mecanismos. Los tres mecanismos principales se representan en la Tabla 5.1 (114).

Se ha obtenido evidencia que muestra la existencia de tres formas diferentes de modificaciones post-traduccionales de la ODC (21):

- 1) Formas múltiples, distintas física y cinéticamente, de la ODC.
- 2) Alteraciones que involucran un grupo tiol reactivo de la ODC y,
- 3) Interacción de la ODC con otras proteínas y ácidos nucleicos.

En general, la regulación post-traducciona l de la función catalítica de enzimas biosintéticas se ha documentado con una fosforilación reversible por proteínas cinasas y fosfoproteína fosfatasas (43).

Han sido reportadas modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación o transglutaminación (77).

5.1 CONTROL A NIVEL DE LA SINTESIS DE RNA

La actividad de la ODC se incrementa considerablemente en una variedad de sistemas eucarióticos y en algunas instancias se ha demostrado que su incremento precede o es paralelo a un incremento en la biosíntesis y acumulación neta de poliaminas

TABLA 5.1
REGULACION POSTTRADUCCIONAL DE LA ACTIVIDAD DE LA ODC

COMPONENTE	PROPIEDADES	ACTIVADOR
Antienzima	Proteína, PM ^o 26000	Putrescina 1-10mM
Proteína cinasa (dependiente de poliaminas)	Proteína, PM ^o 28000	Espermidina, espermina, calmodulina
Transglutaminasa	Proteína, PM ^o 70000- 100000	Iones calcio

a PM= peso molecular (114)

y RNA en una variedad de tejidos animales (58). En muchos sistemas celulares, la síntesis de DNA es precedida por una estimulación de la síntesis de RNA ribosomal (64).

Los datos de Gaza, Short y Lieberman de hígado de rata regenerado utilizando actinomicina D, la cual inhibe la síntesis de DNA dependiente del RNA, demuestra que la formación de RNA es esencial para el primero de los picos bifásicos de la actividad de la ODC. El segundo incremento depende de la formación de RNA durante el período del primer incremento en la actividad. Los resultados de Clarck en células 3T3 utilizando cordicepina, la cual inhibe la aparición de síntesis de DNA dependiente del RNA en el citoplasma, sugieren lo mismo (64).

5.2 CONTROL TRADUCCIONAL POR POLIAMINAS

Hay evidencia considerable que indica una regulación post-transcripcional de la ODC por poliaminas. Los resultados en carcinoma oral humano, en linfocitos y en hígado regenerado de rata in vivo demuestran el rápido efecto post-transcripcional de

putrescina,espermidina o espermina exógena en el decremento de la actividad de la ODC.

Datos experimentales en células 3T3, células hepáticas de rata y células HTC muestran que aunque la putrescina es un inhibidor competitivo débil, su utilización en concentraciones bajas para bloquear la ODC in situ en estas células no fueron suficientes para causar una inhibición in vitro directa de la actividad de la enzima.

Clark y Fuller proponen un mecanismo para el control post-transcripcional después de obtener evidencia indirecta que muestra que las poliaminas bloquean específicamente la síntesis nueva de la enzima en células 3T3 mientras que Caneliakis y Theoharides indican que el tratamiento de células HTC con concentraciones bajas de putrescina y otras poliaminas causan la desaparición de la ODC inmunoreactiva (109).

Se ha demostrado en células KB en crecimiento, en linfocitos, en hígado regenerado de rata y en células 3T3 que la putrescina y espermidina tienen un efecto bloqueante sobre la inducción de la ODC. La espermina ($10^{-5}M$) y espermidina ($6 \times 10^{-5}M$) pueden bloquear la síntesis de ODC en células hepáticas de rata (HTC) sugiriendo un control post-transcripcional de la enzima por estas aminas.

La putrescina adicionada a células HTC en una concentración baja ($10^{-6}M$) causa un decremento en la actividad de la ODC. El efecto de esta fue independiente de la síntesis de RNA. Esto confirma las siguientes sugerencias de un control post-transcripcional de la ODC por putrescina. La putrescina exógena podría tener un efecto directo o indirecto sobre la actividad de la enzima o alterar las rutas degradativas o sintéticas de la ODC (61).

La vida media aparente tan corta de la ODC es regulada en parte por el producto obtenido por su reacción, putrescina, mediante una inhibición por retroalimentación (77).

5.3 INDUCCION DE UNA ANTIENZIMA O SU LIBERACION POR POLIAMINAS

Uno de los aspectos más interesantes en la regulación de la ODC es un mecanismo regulatorio único (19, 101) que involucra efectos macromoleculares positivos y negativos de la ODC. El efecto negativo, un inhibidor proteínico de la ODC, llamada antienzima (19) es el mayor avance no sólo en el área limitada al control de la síntesis de poliaminas sino también en el campo de la regulación de la enzima en general (34).

Esta antienzima es una proteína (21, 62) y un inhibidor no competitivo de la ODC (19, 35, 61) con bajo peso molecular y constituye parte del control normal del mecanismo que define el nivel de actividad de la ODC (35) y es producida en respuesta al incremento de los niveles de poliaminas o sus análogos (35, 49,

62, 66, 101). La anti enzima se acumula bajo condiciones de exposición a diaminas exógenas (77).

La anti enzima es inducida por varias diaminas o poliaminas y localizada en varios tejidos y células animales (49) incluyendo hígado de rata, células hepáticas H-35 de rata, células HTC, células leucémicas L 1210 de ratón, células neuroblásticas N-18 de ratón (49, 109), tiroide de rata (114), cultivos primarios hepáticos de rata, hígado de pollo (49), células HeLa (27) y *Escherichia coli*. La anti enzima se localiza en la fracción citosólica y aparece con un rápido número de recambio con una vida media comparable con la de la ODC (49).

La anti enzima se une a la ODC específicamente formando un complejo (19, 22, 62, 109) inactivo enzima-anti enzima (19, 22, 109) inhibiendo la actividad de la enzima (62). En la presencia de anti enzima, la reacción enzimática procede linealmente en una ruta reducida (Figura 5.1). Esto excluye la posibilidad de que la anti enzima es una enzima, tal como la proteasa, inactivando a la ODC. Varias evidencias indican que la anti enzima inhibe a la ODC por formación de un complejo con la misma. Primero esta acción inhibitoria es estequiométrica (Figura 5.2). Segundo una análisis por filtración en gel muestra que reaccionan cantidades equivalentes de anti enzima y ODC. Tercero, el complejo inactivo de la ODC y la anti enzima, determinado con la ayuda del inhibidor de la anti enzima, es eluido lentamente antes del análisis de la ODC libre en filtración en gel (49).

La tabla 5.2 resume las propiedades de las diferentes anti enzimas de diversas fuentes.

Se ha aislado la anti enzima de ODC de células tumorales de Elish tratadas con putrescina durante su crecimiento in vivo (103).

Se ha reportado la presencia de anti enzima en células hepáticas H-35 de rata, células leucémicas L 1210 de ratón, células neuroblásticas (61) y en células eucariotes (66) en respuesta a altas concentraciones de putrescina, espermina y espermidina (61, 66).

En otros sistemas celulares, la anti enzima es inducida por 1, 3 diaminopropano (DAP) también como por poliaminas (61). En hígado de rata y en cultivos de células es inducida por poliaminas (22, 101) o sus análogos (101).

En hígado de pollo es inducida por la administración de DAP y por

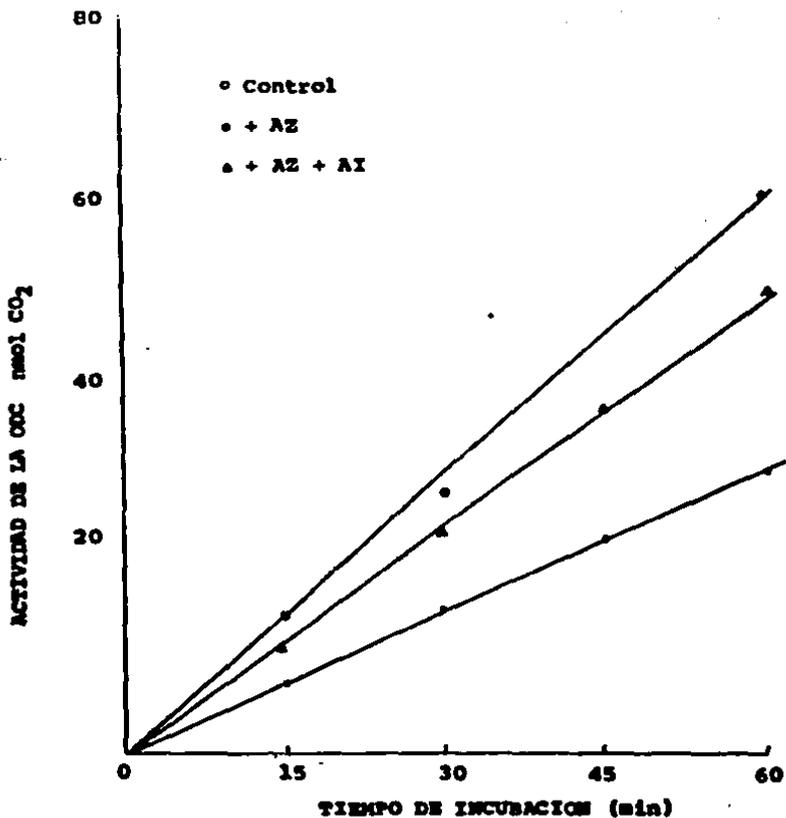


Fig. 5.1 Efecto de la antiangiotensina (AZ) y de la antiangiotensina tras su inhibición (AI) sobre la actividad de la CDC (49).

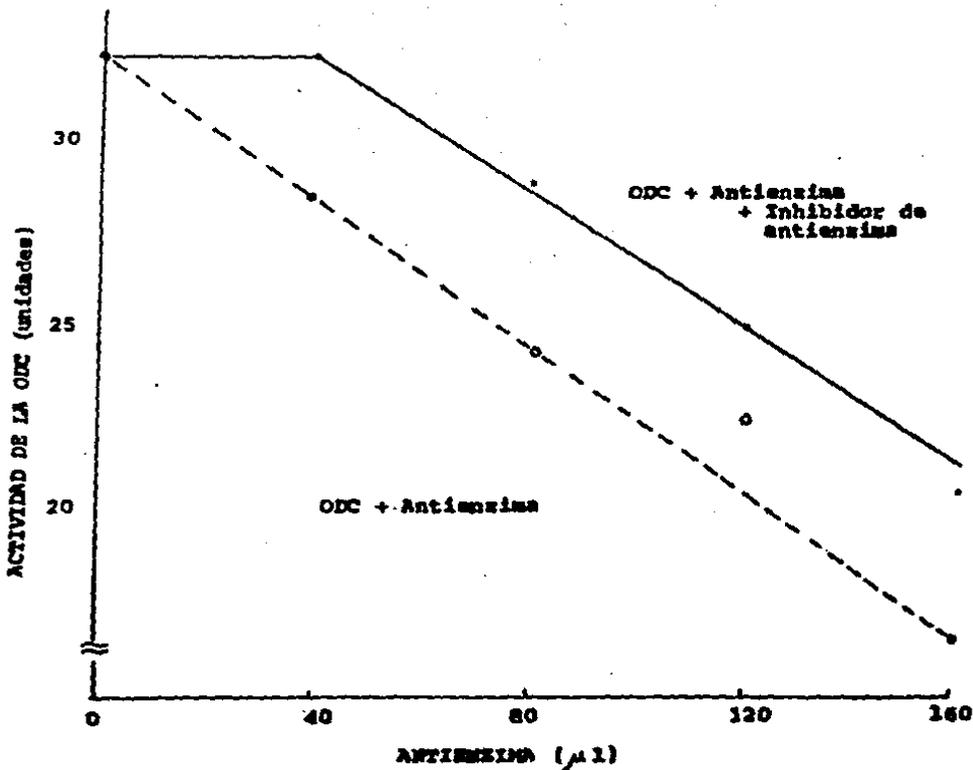


Fig. 5.2 Titulación de la ODC con antiienzima en la presencia y ausencia de cantidades fijas del inhibidor de la antiienzima (49).

TABLA 5.2
PROPIEDADES DE LAS ANTIENZIMAS DE DIVERSAS FUENTES BIOLÓGICAS

F U E N T E	PESO MOLECULAR APROXIMANTE	TIEMPO DE VIDA MEDIA EN MINUTOS	PI	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (unidades/mg de proteína)	REFERENCIA
BACTERIAS					
<i>Escherichia coli</i>	15000 ^a , 20000 ^a				66
ACIDA	49500		3.8 3.5	4.4 ^c	50 20
BASICA	9000 y 11000 ^d		9.5 9-10	45 ^c	50 20
MAMÍFEROS					
Hígado de rata	24500 ^e 23500 ^e 24500			60 ^b 59.6	49 101 22
		18-66			
Hígado de pollo		12.8			22
Células hepáticas de rata		12.8			22
Cerebro de ratón	26500 ^f	18-66			19

- a estimado en filtración en gel
- b unidades/mg de proteína
- c (unidades/mg de proteína) x 10⁻³
- d estimado por SDS-PAGE (10% poliacrilamida)
- e daltons y es sensible a tripsina
- f lábil al calor y sensible a tripsina

espermina, espermidina y cadaverina (22).

La adición de putrescina o de poliaminas a cultivos de células de mamíferos así como su administración a ratas, estimula la aparición de la antiienzima. Se ha demostrado su presencia en el mutante MA255 de *Escherichia coli* con propiedades similares a la antiienzima de mamíferos y cuyo nivel de actividad se incrementa por la presencia de putrescina (50).

Se ha descubierto otro factor proteínico en hígado de rata, inhibidor de la antiienzima, que inactiva específicamente a esta antiienzima al formar un complejo. El inhibidor de la enzima reacciona con la ODC en el complejo inactivo enzima-antiienzima (49, 101, 114).

Se especula que este inhibidor de la antiienzima es una forma modificada de la ODC, que puede ser fosforilada o transaminada (114).

El inhibidor de la antiienzima inhibe específicamente a la antiienzima y reactiva a la ODC después de su inactivación por la antiienzima (101). En forma aparente el inhibidor de la antiienzima inhibe a esta al formar un complejo con la misma.

Este inhibidor reacciona con la ODC en el complejo inactivo enzima-antiienzima, por liberación de la enzima. El inhibidor actúa independientemente del tiempo y de una manera estequiométrica.

La presencia del inhibidor de la antiienzima se ha demostrado en el extracto de hígado de rata en el cual la ODC se ha inducido por tioacetamida y ácido DL-alfa-hidracino-delta-aminovalérico. El inhibidor no coexiste con la antiienzima y se localiza en la fracción citosólica (49).

En la tabla 5.3 se presentan las propiedades del inhibidor de la antiienzima de hígado de rata.

TABLA 5.3

PROPIEDADES DEL INHIBIDOR DE LA ANTIENZIMA DE HIGADO DE RATA

PESO MOLECULAR	INACTIVACION	REFERENCIA
105000	Tratamiento a 70°C por 15 min ó tratamiento con tripsina	49, 101

5.4 TRANSICIONES ENTRE UNA FORMA ACTIVA Y UNA MENOS ACTIVA (ISOENZIMA O FORMAS MÚLTIPLES)

Se ha demostrado el control de la ODC a nivel de la transcripción y de la traducción. Este control podría ejercerse por modificaciones pos-traslacionales de esta enzima, tal como el ejemplificado por las isoformas cargadas que se han aislado de esta enzima en varios tejidos (115). Dentro de una célula simple hay formas múltiples de la ODC y su interconversión de estas isoenzimas (55, 117) o modificaciones post-transcripcionales (117) podrían estar relacionadas con la regulación de la actividad de esta enzima (55, 117).

Las isoenzimas son formas múltiples de una enzima determinada; pueden presentarse en una sola especie de organismo e incluso en una sola célula. La existencia de estas formas múltiples puede destacarse y separarse mediante electroforesis en gels de extractos celulares; puesto que están codificados por genes diferentes las isozimas difieren en su composición aminoácida y por lo tanto en los valores de sus pIs isoelectrónicas. Generalmente las isozimas están constituidas por mezclas íntimamente asociadas de diferentes clases de cadenas polipeptídicas, en las que están combinadas las propiedades cinéticas y de enlace específicas aportadas por cada tipo de cadena (88).

La modificación covalente de una enzima por enzimas modificadas específicas tal como las proteínas cinasas y proteínas fosfatases generalmente resulta en dos o más formas de regular la enzima que difiere en su actividad y/o estabilidad. Se ha encontrado que las formas múltiples de una enzima cambian en asociación con diferentes hormonas o agentes inductores.

En la regulación de la actividad de la ODC se ha descubierto que están presentes en las células dos formas física y cinéticamente distintas (37) y probablemente no se limitan a eucariotes simples. Hay evidencia de la existencia de dos formas de la ODC con distinta activación con PLP en células de hamster chino (37) y en hígado de rata (37, 117). Se ha demostrado la existencia de dos formas de ODC, con respecto a la afinidad por PLP, en el crecimiento exponencial de células 3T3 (36, 37).

Se han observado dos formas monoméricas de ODC distintas en crudo y en la enzima altamente purificada de riñón de ratón, hígado de rata y en células hepáticas de rata, y en otros se ha visto en corazón de rata altamente purificada y en hígado de ternera. Esta distinción entre las formas no es afectada por la completa ausencia de la coenzima (PLP) y no se relaciona a un peso molecular bajo de las especies de ODC (115).

En la tabla 5.4 se resumen las propiedades de las diferentes isoenzimas.

TABLA 9.4
 PROPIEDADES DE LAS LICORIAS DE DIVERSAS FUENTES BIOLÓGICAS

F U E N T E	DE FORMA CASITIVA (µm)	DE FORMA PLP ^a (µm)	pH	PH OPTIMO	PESO MOLECULAR	COMBINACION	REFERENCIA
MORCOS							
<u><i>Physarum polycephalum</i></u>							
FORMA A	0.08	0.13 0.13 0.59	5.5 5.5 5.5		80000-90000 80000	PLP PLP	37 21 42
FORMA B	0.09	32.0 32.0 18.8	5.9 5.9 5.9		160000 80000	PLP PLP	37 21 42
MEXICO							
Diferentes fuentes de manifesto en general							
FORMA I				9.7			119
FORMA II				9.6			115
Céleste 372							
FORMA I				10.0	90000	PLP	36
FORMA II				0.4	180000	PLP	36

a PLP= fructos de piridina

En *Physarum polycephalum*, así como en tejidos eucarióticos, la actividad de la ODC es regulada en función del metabolismo celular. El mecanismo de este control sensible involucra dos formas distintas física y cinéticamente de la enzima. Una de estas formas podría unirse a la coenzima débilmente, pero es relativamente menos estable, sugiriendo que esta forma podría ser un estado intermedio de la enzima que puede convertirse a la forma activa o degradativa por enzimas proteolíticas, dependiendo del estado metabólico celular. Es evidente que la interconversión entre estas formas es un punto importante, y quizás limitante, del control en la biosíntesis de putrescina (37).

La presencia de formas múltiples en sistemas de mamíferos no se ha correlacionado directamente con la regulación in vivo de la actividad de la enzima. Esto podría reflejar un sistema de distribución de la formas de ODC, o la forma B podría ser extremadamente lábil in vitro cuya conversión de la forma A a la B podría detectarse sólo con la pérdida en la actividad total de la ODC (37).

La cromatografía de intercambio iónico en DEAE a revelado la presencia de estados múltiples iónicos del aislamiento de la ODC activa de varios tejidos de ratón, rata y vaca. Muchos laboratorios han caracterizado a la ODC nativa de mamíferos como un dímero que puede ser disociada en dos subunidades idénticas. Recientemente se ha reportado una correlación entre la disolución inducida por sal y la inactivación de la enzima. Se ha sugerido que la ornitina podría controlar su inactivación estabilizando su dimerización la cual es promovida por la coenzima PLP (115).

5.5 REGULACION POR HORMONAS

La activación de la ODC generalmente asociada con la síntesis macromolecular tan bien como el crecimiento y división celular sugiere que es un prerequisite para la iniciación de la síntesis de DNA (104).

Los procesos de crecimiento, durante los cuales se incrementa la actividad de la ODC, incluyen la embriogénesis (26, 28, 72, 73), hipertrofia e hiperplasia (26, 28), hígado regenerado de rata (72, 73), la respuesta anabólica de tejidos a hormonas tróficas (26, 28, 72, 73) y proliferación celular en cultivos. Hay tres categorías distintas de hormonas, que provocan la inducción de la ODC como parte del proceso de crecimiento de tejidos (26, 28):

- 1) Hormonas tróficas (ACTH, TSH, LH, hormona del crecimiento y catecolaminas), las cuales afectan la transcripción a través de un mecanismo que involucra la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc.

- 2) Hormonas esteroides (estradiol), que afectan el proceso transcripcional para promover la inducción de la ODC por su unión a receptores citoplásmicos seguido por una transferencia del complejo receptor al núcleo.

T) Factores de crecimiento hormonales (factor de crecimiento epidérmico o de un nervio).

Estas hormonas tienen receptores de membrana que no se unen a la activación de la adenilato ciclasa. El mecanismo de acción de estos agentes es hasta ahora desconocido en relación a como la señal inductora es transferida de la membrana al núcleo, si su acción se ejerce a nivel transcripcional o traduccional (26).

Numerosos estudios sugieren la existencia de una relación metabólica entre una extensa variedad de hormonas y la regulación de la biosíntesis de poliaminas en varios estudios incluyendo la hormona luteinizante (LH), estradiol, hormona del crecimiento, ACTH y cortisol (68).

Hay evidencias considerables de que la inducción de la ODC durante el progreso del ciclo celular, es regulada transcripcionalmente por la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc y su translocación al núcleo donde se afecta la lectura genética (69).

La glicoproteína luteinizante de la pituitaria (LH la cual causa la ovulación y la consecuente producción de esteroides por el cuerpo lúteo) induce la actividad de la ODC en ovario de rata (28, 61). Esta inducción aparece seguida de la estimulación de prostaglandina y su acumulación. Por otra parte la prostaglandina E2 estimula la actividad de la enzima in vivo en ovario de rata (28).

Asimismo la gonadotropina coriónica humana (HGC) estimula la actividad de la ODC en ovario de rata y el cAMP podría en parte regular a la enzima (68).

Recientemente se demostró que la administración de relaxina, una hormona del embarazo, incrementa significativamente la actividad de la ODC en el útero y otros tejidos del ratón en pocas horas (28).

La ACTH exógena, la hormona del crecimiento y el cortisol incrementan la actividad de la ODC en riñón de rata hipofisectomizada (68).

Las hormonas del crecimiento de humano, bovino y ovino causan un incremento en las actividades de las ODCs de cerebro e hígado fetal y neonatal. Varios polipeptidos con hormonas del crecimiento poseen la habilidad de estimular la ODC.

El lactógeno placentario ovino, una hormona peptídica, presente en altos niveles en el feto durante el segundo periodo del embarazo, es comparable a la hormona de crecimiento ovina en su habilidad para estimular la actividad de la ODC en cerebro e hígado neonatal de rata.

En numerosos tejidos (hígado, riñón, bazo y suprarrenal) la prolactina estimula la actividad de la ODC.

La insulina, la prolactina y glucocorticoide, en combinación, incrementan la actividad de la ODC. Esto sugiere que el incremento inicial de la actividad de la enzima se afecta a nivel post-transcripcional, donde los incrementos posteriores son modulados a niveles transcripcional y traduccional (25).

La insulina estimula la actividad de la ODC en células HTC por un mecanismo que actúa parcialmente a nivel post-transcripcional (87) y se ha observado un incremento rápido en su actividad en cultivos de células hepáticas y de riñón en hamster recién nacido después de la adición de suero o insulina (71).

En el músculo del corazón, la ODC juega un papel crucial, porque su actividad se incrementa en condiciones que correlacionan con una actividad funcional elevada del músculo. En realidad numerosas hormonas podrían estimular la actividad de la ODC cardíaca. En particular la promoción de la activación de la ODC ha sido reportada por tratamiento con adrenalina, noradrenalina y hormona del crecimiento.

Los mecanismos por los cuales las catecolaminas permiten la activación de la ODC cardíaca no se conocen exactamente. Algunas investigaciones muestran que el incremento en la actividad de la enzima es controlada a nivel transcripcional por AMPc mediante la activación de una proteína cinasa dependiente del AMPc (98).

La inducción de la ODC durante la fase G1 del ciclo celular parece ser universal y esencial para la progresión del ciclo celular. Esta inducción se ha demostrado en 23 tipos de células en respuesta a varios estímulos del crecimiento. Los estudios de los efectos de los retinoides para inhibir el crecimiento celular en ovario de hamster chino (CHO) indican que las células son bloqueadas en la fase G1 del ciclo celular.

Los retinoides sólo inhiben la inducción de la actividad de la enzima cuando se adicionan en las primeras 2 a 3 horas de la progresión de la fase G1. Se ha postulado que la inducción de la ODC es un requisito para la progresión de la fase G1 y que las propiedades antiproliferativas de los retinoides están relacionadas con la habilidad específica para inhibir esta expresión. Ya que los retinoides no alteran, dramáticamente la ruta de la síntesis proteica, su habilidad para inhibir la ODC podría relacionarse con su habilidad para inhibir al mRNA para la síntesis de la enzima (69).

Estudios sincrónicos de la progresión del ciclo celular de células normales y transformadas incluyendo células CHO, muestran que la transcripción dependiente de la inducción de la ODC ocurre como un evento temporal máximo durante la transición de la fase G1 a la S (72, 73).

El tratamiento con estradiol incrementa los niveles de putrescina en útero de rata castrada por estimulación de la actividad de la

ODC (28, 36).

Se ha reportado un incremento en la actividad de la enzima en epidermis de pollo expuesta al factor de crecimiento epidérmico y en linfocitos humanos estimulados por fitohemaglutinina (36).

5.6 ESTIMULACIÓN E INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ODC POR VARIOS NUCLEOTIDOS DE GUANINA

Varias observaciones sugieren que el nucleótido guanosina-5'-difosfato-3'-difosfato (ppGpp) está involucrado en la regulación de la ODC. Se postula que la ODC tiene una alta afinidad por la guanosina 5'-trifosfato (GTP), el cual puede activar la enzima, por lo que el ppGpp podría competir como análogo estructural con el GTP por la ODC y causar una inhibición de la biosíntesis de putrescina (62).

Se ha observado que el GTP y el ppGpp actúan como activador e inhibidor, respectivamente, de la ODC de *Escherichia coli*. Se concluyó que la inhibición de la síntesis de RNA es acompañada por un cese de la síntesis de poliaminas que es el enlace para la inhibición de la ODC por ppGpp (65). La inhibición específica y competitiva de la enzima por ppGpp (62, '70) sugiere que los cambios en la acumulación de putrescina y espermidina son debidos parcialmente a la aparición de polifosfato(s) de guanosina (70).

Parece razonable concluir que la regulación de la síntesis de putrescina en *E. coli* involucra el ppGpp existiendo una correlación directa entre los niveles de ppGpp y la síntesis de ODC o su actividad (62).

En *E. coli* existen dos ODCs diferentes: la biodegradativa y la biosintética, cuyas actividades se aumentan por GTP y por otros nucleótidos fosfatos *in vitro*; la ppGpp es un inhibidor de la ODC biosintética *in vitro*. Se sugiere que la síntesis de RNA y de poliaminas se regulan coordinadamente *in vivo* por el nivel intracelular de estos nucleótidos regulándose la actividad de la ODC por estos *in vivo* en *E. coli* MA255 (66).

La ODC parcialmente purificada de *E. coli* CP78 fue inhibida por ppGpp de una manera competitiva con respecto a GTP, el activador de la enzima sugiriendo que la síntesis de poliaminas en *E. coli* CP78 es regulada por ppGpp (70).

5.7 CONTROL OSMÓTICO DE LA ODC POR CATIONES MONOVALENTES

Se ha reportado que $10 \mu\text{M}$ de varios cationes (Mg^{++} , K^+ , Na^+) bloquean la inducción de la ODC en células hepáticas H-35 de rata, L 1210 y células de neuroblastoma (61, 118).

El efecto inhibitorio de estos cationes sobre la inducción de la

actividad de la ODC en diferentes líneas celulares sugiere que la función intracelular de la ODC, y de los productos de su reacción (putrescina, espermina y espermidina), podrían estar involucrados íntimamente con los cambios en el nivel de los cationes (118).

5.8 REGULACION DE LA ODC A NIVEL MOLECULAR

Un incremento en la actividad de la ODC parece ser uno de los primeros cambios que se dan después de la estimulación de la proliferación celular en muchos sistemas celulares (106).

La proliferación celular incluye dos procesos principales: crecimiento celular y división.

El proceso de crecimiento sirve para duplicar todos los elementos estructurales y la capacidad funcional de la célula. El paso clave del crecimiento celular es la duplicación del DNA, que es un requisito genético absoluto para la división celular.

Los procesos de duplicación de DNA y la mitosis están bien identificados y permiten dividir el ciclo celular en cuatro fases sucesivas: G₁, S, G₂ y M.

G₁ es el período entre la mitosis (M) y la síntesis de DNA (s), y G₂ es el período entre S y M. La fase intermitótica (G₁, S y G₂) se caracteriza por un crecimiento celular continuo.

En la fase G₁ del ciclo celular están contenidos numerosos pasos, algunos de los cuales son esenciales para el inicio de la duplicación del DNA.

Uno de los primeros cambios que tienen lugar después de que las células entran en G₁, es un incremento en la actividad de ODC (91).

Hay evidencia considerable en adenovirus tipo 5 que sugiere que la acumulación de poliaminas en las células es un requisito para la subsecuente síntesis de DNA. La ODC es dependiente del ciclo celular, con un primer pico en la fase G₁, precediendo la iniciación de la síntesis de DNA, y un segundo pico en G₂. La inhibición de esta enzima inhibe la síntesis de DNA en varios sistemas seguido de un estímulo proliferativo (64).

La inducción de la ODC durante la fase G₁ del ciclo celular parece ser universal y esencial para el desarrollo del ciclo celular. Esta inducción se ha demostrado en 23 tipos de células en respuesta a varios estímulos del crecimiento (69).

En células Don C la actividad de la ODC varía durante el ciclo celular, incrementándose durante la etapa final de G₁ y la

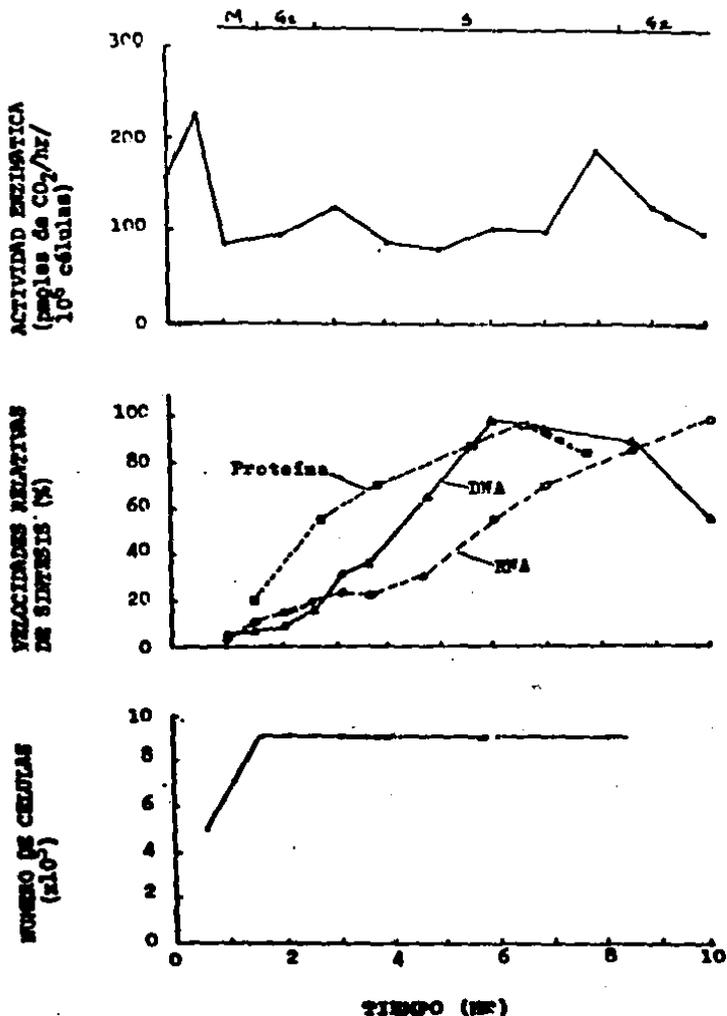


Fig. 5.3 Actividad de la ODC, velocidades relativas de síntesis de RNA, DNA y proteínica y número de células durante el ciclo de células Don C. (58).

inicial de S y la fase final de S (Figura 5.3). En adición, un tercer pico de actividad parece presentarse en la fase M previa a la división celular la cual podría presentarse durante la fase G2 del ciclo (58).

En muchos sistemas la inducción de la ODC es mediada por AMPc, el cual activa a la proteína cinasa. En otros modelos el incremento en la actividad de la enzima parece estar disociada de los cambios en el contenido de AMPc, sugiriendo mecanismos alternativos de la regulación de la enzima (30).

El AMPc tiene un efecto predominante a nivel de la transcripción en las células eucarióticas y podría regular negativamente a la ODC en una manera indirecta por la estimulación de una síntesis de una molécula represora no caracterizada la cual inhibe la actividad de la enzima (81).

Existe la posibilidad de que la inducción de la actividad de la ODC por AMPc representa un evento crucial en una autoregulación del contenido de AMPc disparado por incremento del mismo AMPc, como se ilustra en la figura 5.4 (30).

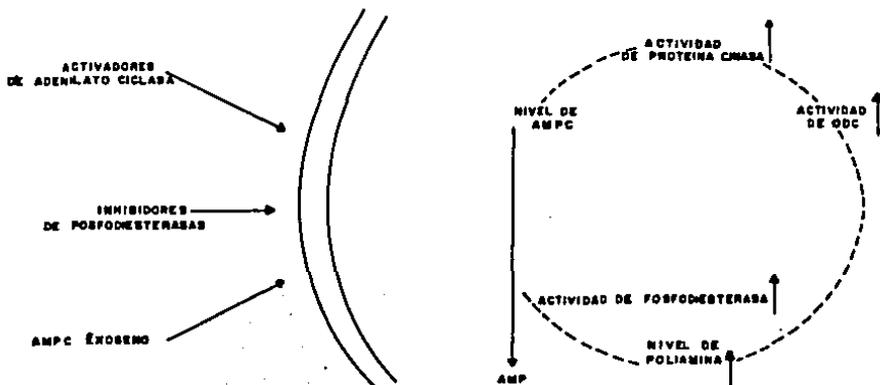


Fig. 5.4 Inducción de la actividad de la ODC por AMPc (30).

Las generalizaciones en cuanto a el papel del AMPc en la regulación de la actividad de la ODC hepática están basadas en estudios en animales intactos y aunque el AMPc podría incrementar la actividad de la ODC en algunos sistemas experimentales, las generalizaciones en cuanto a la regulación intracelular de la enzima parecen prematuras con referencia a estudios de varios tejidos normales de diferentes especies (38).

El control negativo de la ODC por AMPc es aparentemente muy específico. Este resultado es evidencia de que el AMPc juega un papel importante en la regulación de la putrescina por esta enzima.

La regulación negativa de las dos vías para la biosíntesis de putrescina (a partir de L-ornitina ó L-arginina) por AMPc representa un nuevo control para la biosíntesis de poliaminas en *Escherichia coli*.

Después, la formación de putrescina es considerada la limitante en la producción de poliaminas. El control de la actividad de la ODC por AMPc provee una explicación para los cambios en los niveles de poliaminas como una función de la ruta de crecimiento por ejemplo la concentración intracelular de AMPc.

Se sugiere que la actividad de la ODC puede inducirse por cambios en nucleótidos cíclicos tales como el AMPc y la actividad de la enzima en cultivo de células de hueso es regulada por cambios en la concentración del AMPc (104).

CAPITULO VI. INHIBICION

Durante los últimos años ha existido mucho interés en el desarrollo de sustancias inhibidoras de la síntesis de poliaminas ya que están involucradas en el proceso de proliferación celular (91, 111).

La mayor parte de la investigación realizada hasta el presente, se ha enfocado hacia las descarboxilasas, en especial a la búsqueda de inhibidores de la ODC (91). Esta inhibición no es fácil de estudiar por su vida media tan corta, siendo rápidamente inducida, regulada por el producto de su reacción y estabilizada contra la degradación por inhibidores competitivos (82).

Estas consideraciones dictan que una adecuada inhibición de la enzima debería ser con un inhibidor irreversible el cual persista dentro de los tejidos (82).

Los inhibidores utilizados para la ODC caen dentro de las siguientes categorías (1, 91, 111):

1) Análogos estructurales de ornitina y putrescina, los cuales actúan como inhibidores competitivos de la ODC.

2) Compuestos que compiten con el cofactor de la enzima.

3) Diaminas y sus derivados que actúan como represores de la síntesis de ODC.

El desarrollo preferencial de inhibidores de descarboxilasas puede explicarse por dos razones (91):

1) Se cree que la velocidad de descarboxilación de la ornitina es limitante en la regulación de los pasos biosintéticos de las poliaminas. Aunque, en algunos casos, la síntesis de ornitina podría ser el factor limitante.

2) Los mecanismos catalíticos de las transferasas (espermidina sintetasa y espermina sintetasa) no han sido bien elucidados.

Algunos inhibidores parecen unirse irreversiblemente a la enzima que inhiben; pero algunos, como la DL-Difluorometilornitina (DL-DFMO), se unen irreversiblemente y son entonces los más efectivos (111).

En la tabla 6.1 se enumeran algunas de las sustancias que bloquean de manera efectiva la síntesis y acumulación de poliaminas en la célula viva (1).

6.1 ANALOGOS ESTRUCTURALES DE ORNITINA Y PUTRESCINA

La mayoría de los análogos estructurales son inhibidores reversibles competitivos de la ODC (31, 111). Algunos

TABLA 6.1
INHIBIDORES DE LA ORNITINA DESCARBOXILASA

ENZIMA	INHIBIDOR	MECANISMO DE ACCION
Ornitina descarboxilasa (ODC)	ANALOGOS DE SUSTRATO:	
	A. DL- α -hidracinoornitina	Reversible y competitivo
	B. DL- α -metilornitina	Reversible y competitivo
	C. DL- α -hidracino-metilornitina	Reversible y competitivo
	D. Trans-3-dehidro-DL-ornitina	Reversible y competitivo
	E. DL- α -DFMO	Irreversible
	ANALOGOS DEL PRODUCTO:	
	F. Trans-1,4-diamino-2-butano	Reversible y competitivo
	G. 1,4-diaminobutanona	Reversible y competitivo
	H. 5-hexino-1,4-diamina	Irreversible
	I. Trans hex-2-en-5-ino-1,4 diamina	Irreversible
	J. Homólogos de diaminas con 3-12 átomos de carbono	Indirecto. Ej.: por inducción de la proteína que inhibe a la ODC (ODC-antiasmia)
	K. 1,3-diamino-2-propanol	Indirecto

(1, 91)

inhibidores, como la alfa-metilornitina (alfa-MO), alfa-hidrazinornitina y 1,4-diaminobutanona, causan un incremento en la actividad de la ODC in vivo como resultado de la estabilización de la enzima. La vida media de la enzima se prolonga al unirse con los inhibidores. La inhibición in vivo puede ser revertida al incrementar la concentración de fosfato de piridoxal (11).

Entre estos análogos tenemos:

6.2 ALQUIL Y ARIL ORNITINAS SUSTITUIDAS

De estos derivados el más potente es la alfa-MO la cual se ha utilizado ampliamente para inhibir la síntesis de putrescina. Altas concentraciones de fosfato de piridoxal no revierten el efecto inhibitorio de la alfa-MO la cual estabiliza a la enzima contra su degradación. Mc Cann et al sugirieron que podría tener un efecto indirecto sobre la síntesis de la enzima (11)(Tabla 6.2).

La (2)-alfa-MO generalmente causa una reducción en la concentración de putrescina y un pequeño decremento en la concentración de espermidina (25). Se ha observado que la (2)-alfa-MO es un potente inhibidor competitivo de la ODC de mamíferos de diferentes tejidos (25). Pero es un sustrato para la ODC parcialmente purificada de *Escherichia coli* (114).

La alfa-MO inhibe la ODC (aunque con una K_i de $20 \mu\text{M}$) independientemente de la concentración de fosfato de piridoxal (114).

Este compuesto compete con la L-ornitina con una K_i de $20 \times 10^6 \text{ M}$ inhibiendo la síntesis de putrescina y espermidina en células hepáticas de ratas, previene la proliferación celular y la replicación de DNA.

Este inhibidor, similar a otros análogos de ornitina, incrementa la vida media de la ODC, aparentemente por interacción con el sitio activo (108).

Se han sintetizado varios análogos de alfa-alkil y alfa-araalkil sustituidos y se ha probado su efecto in vitro como inhibidores de ODC de próstata de rata. Estos compuestos son mucho menos efectivos que la (2)-alfa-MO. El compuesto más activo de esta serie es la alfa-n-octil-(2)-ornitina que es 60 veces menos activa que la (2)-alfa-MO y la alfa-n-butyl-(2)-ornitina que resulta 270 veces menos activa que la (2)-alfa-MO. La alfa-ciano-metil-(2)-ornitina es un inhibidor irreversible de la ODC (25).

6.3 ACIDO 5-AMINO-2-HIDRAZINO VALERICO (ALFA-HIDRAZINORNITINA)

Harik y Snyder (1973) fueron los primeros en demostrar que este compuesto es un inhibidor de la ODC, el cual es un derivado alfa-

hidrazino del ácido 5 aminovalérico, cuyo mecanismo de inhibición es más complejo que el de la alfa-MO. Este actúa competitivamente con respecto a la ornitina tanto en *Escherichia coli* como en próstata de rata y su inhibición se reduce enormemente en presencia de altas concentraciones de fosfato de piridoxal. Este compuesto es un inhibidor no competitivo con respecto a la alfa-hidrazinoornitina. La hidrazina, por sí misma, es un inhibidor competitivo de la ODC con respecto al fosfato de piridoxal probablemente debido a su interacción con el grupo carbonilo del mismo. La alfa-hidrazinoornitina es un inhibidor más efectivo que la hidrazina y específica para la ODC. Parte de sus propiedades inhibitorias podrían deberse a su habilidad para reaccionar con el fosfato de piridoxal y su alta selectividad a la semejanza con el sustrato.

Se ha demostrado que el ácido DL-alfa-hidrazino-delta-aminovalérico (HAVA) es un potente inhibidor competitivo de la ODC (15, 111) cuya inhibición se reduce por la adición de fosfato de piridoxal (111).

Cuando se agrega alfa-hidrazinoornitina a un medio de cultivo de células hepáticas se incrementa la actividad de la ODC y su vida media de 10 a 28 minutos a semejanza con la alfa-MO (111) (Tabla 6.2).

Este inhibidor es relativamente selectivo, otras enzimas dependientes de fosfato de piridoxal no son sensibles como la ODC de próstata de rata ($K_i 2 \times 10^{-6} M$). Este análogo de ornitina también inhibe la acumulación de putrescina en hígado regenerado de rata y en cultivo de células hepáticas de rata. La inhibición por alfa-hidrazinoornitina se reduce significativamente con altas concentraciones de fosfato de piridoxal (108).

La alfa-hidrazinoornitina inhibe la ODC de *Escherichia coli* ($K_i 0.5 \mu M$) y la ODC de próstata de rata ($K_i 2 \mu M$) (114).

Se ha reportado el efecto de HAVA sobre la síntesis de putrescina en las glándulas parótidas de ratón. El tratamiento in vivo con HAVA disminuye de manera importante el aumento de los niveles de putrescina en las glándulas de ratón por administración de isoproterenol (108).

Utilizando DL-HAVA se tiene un valor de K_i para la ODC en hígado y próstata de $0.5 \mu M$ siendo un inhibidor más potente que los derivados insaturados de ornitina y putrescina los cuales tienen valores de K_i de 2.2 y $2.0 \mu M$ respectivamente (114).

El HAVA inhibe la acumulación de putrescina, espermina y espermidina in vitro en linfocitos en los que se induce la ODC y reduce la ruta de la proliferación celular (85).

TABLA 6.2
 AMILOCOS ESTRUCTURALES DE GLUTINA Y PUTRESCINA QUE INTERVENEN A LA COC

COMPUESTO	ESTRUCTURA	PUNTE DE COC	EN PARA DE MILICIONES (CM)	EL PARA DE MILICIONES (CM)	TIPO DE MISICION	NUMERACION DE MISICIONES POR P.L.S.
α -metil(-)ornitina	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{-COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	Prótata de rata Miso de ratón Miso de conejo Mopstoma (MTC) Mictogallina Miso de rata Mopstoma (MTC)	0.13 0.08 0.10 0.087 0.09	0.04 0.034 0.2 0.04 0.04 0.04	C C C C C C	- - - - - -
α -metil(+)-ornitina		Miso de rata Mopstoma (MTC) Prótata de toro	0.087 0.09 0.072	0.019 0.02 0.02	C C C	- - -
α -metil(-)-ornitina		Miso de rata Mopstoma (MTC) Prótata de toro	0.087 0.09 0.072	1.3 1.05 3.0	C C C	- - -
α -metil(+)-glutina		Prótata de rata	0.13	1.2	C	-
α -metil(-)-glutina		Prótata de rata	0.13	11.0	C	-
α -metil(+)-ornitina	$\begin{matrix} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{-COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	Prótata de rata	0.13	4.7	C	-
α -metil(-)-ornitina		Prótata de rata	0.13	2.3	C	-
α -metil(+)-ornitina		Prótata de rata	0.13	5.3	C	-

Tabla 6.2
CONTINUACION

COMPUESTO	ESTRUCTURA	FUENTE DE	COC	EN DATA DE MUESTRA (aM)	EN DATA DE MUESTRA (aM)	TIPO DE LA MUESTRA	INVERSION DE MUESTRA POR P.P.
<i>p</i> -nitro- <i>m</i> -xil etil sulfato		siglo de rata procurado de rata		0.047 0.072	0.3 0.74	C	C
<i>p</i> -nitroacetophenil sulfato	<chem>CC(=O)C1=CC=C(C=C1)S(=O)(=O)C</chem>	procurado de rata		0.072	4.4	C	C
<i>p</i> -nitroacetophenil <i>m</i> -nitroetil sulfato	<chem>CC(=O)C1=CC=C(C=C1)S(=O)(=O)C</chem> <chem>CC(=O)C1=CC=C(C=C1)S(=O)(=O)C</chem>	procurado de rata		0.072	2.5	C	C
Tetraacilol- <i>m</i> - nitro	<chem>OC1OC(C1)S(=O)(=O)C</chem>	siglo de rata procurado (MTC) procurado de rata		0.047 0.09 0.072	0.12 0.14 0.07	C C C	C C C
A. 2, hexa-1,4 dianilic etilo hexa-1-eno- sulfato	<chem>CC=CC=CC=C</chem>	siglo de rata procurado (MTC)		0.047 0.09	0.07 0.07	C C	C C

Tabla 4.3
CONTINUACION

COMPUESTO	ESTRUCTURA	FUENTE DE ODC	PA PARA ODC Mg/m ³ (cal)	PA PARA EL RISGO (cal)	TIPO DE ASIGNACION	REVISION DE RISGO POR PA
Ar. 2,3-dihalo- butano (H-COM) MNH ₂	MNH ₂ MNH ₂ -C(CH ₃) ₂ -C- COM	Productos de rata	9.2x10 ⁻⁴	9.2x10 ⁻⁴	C	♦
		Niveles de rata silenciosos, parásitos de ratón		9.2x10 ⁻⁴	C	♦
				9.2x10 ⁻⁴	C	
-hidroxiacetoni- litas		Escherichia coli	14.0	9.0x10 ⁻⁴	C	♦
		Productos ventral	0.08	9.0x10 ⁻⁴	C	♦
		Niveles de rata		9.0x10 ⁻⁴	C	
Ar. (1,3)-oximo-2 hidroxilo metil- pentanoico MNH ₂	MNH ₂ H ₂ N(CH ₂) ₂ -C- COM COM	Productos de rata	0.06	0.03	C	♦
		Niveles MTC			MCI	
		Niveles de rata		3.9x10 ⁻⁴		
Et. 2-difluoro-2,3- dibromo-1,1,1,3,3- pentafluoro-4- nitro-5-oxo-2,3- dihidro-1H-imidazo-4,5- dion	MNH ₂ MNH ₂ (CH ₂) ₂ -C- COM MNH ₂	Niveles de rata	0.2	4.6x10 ⁻³	C	MC
		Niveles de embudo de pelo	0.15	2.6x10 ⁻³	C	MC

Tabla 6.2
CONTINUACION

COMPUESTO	ESTRUCTURA	PUNTO DE COC	PM PARA OBTENER MUESTRA (mg)	SI PARA LA MUESTRA (mg)	TIPO DE IN- MISION	REVERSION DE MISION POR PLPS
Tetra 1,4 dimetil no 2 buteno	<chem>CH3CH2C(CH3)2CH2CH3</chem>	0.2	0.2	2x10 ⁻³	C	+
1,4 dimetilbut-2- eno	<chem>CH3CH=C(CH3)CH2CH3</chem>	0.2	0.2	0.046	C	-
	<chem>CH3CH2C(CH3)=CH2</chem>	0.25	0.25	0.072	C	
	<chem>CH3CH=CHCH2CH3</chem>	4.4	4.4		M	
	<chem>CH3CH2CH=CHCH3</chem>	0.67	0.67		M	
	<chem>CH3CH=CHCH2CH2CH3</chem>	0.06	0.06	0.9x10 ⁻³	C	
N(5)-fosforil- desetilornitina	<chem>NC(=O)CC(N)C(=O)Nc1ccc(O)cc1</chem>	0.07	0.07		MC	MC
-hidroxil-2 etil ornitina	<chem>NC(=O)CC(O)C(=O)N</chem>			2x10 ⁻³		
Dehidroornitina	<chem>NC(=O)CC(=O)C(=O)N</chem>			4.4x10 ⁻³		
Dehidropirosolina	<chem>NC(=O)CC(=O)N</chem>			2x10 ⁻³		
-acetato de tilidina	<chem>CC(=O)NCC1=CN=CN=C1</chem>			2.3x10 ^{-3c}		

a Pip- fosfato de piridamyl
b Referencia 110
c tiempo de vida media= 9.7 min
d tiempo de vida media= 3.1 min

C= competitivo
MC= no competitivo irreversible
MC= no competitivo
M= no competitivo
M= no competitivo
C= positivo

(333)

6.4 ACIDO 2S AMINO-2-HIDRAZINO-2-METILPENTANOICO

La alfa-MO y el HAVA son inhibidores competitivos de la ODC. Abdel-Murien et al probaron sus efectos al combinarlos con un analogo, el acido (±) 5-amino-2-hidrazino-2-metilpentanoico, que es un inhiididor competitivo de la ODC de prostata de rata, con un valor de Ki intermedio entre la alfa-MO y el HAVA. Cuando se prosó in vivo se observó que resulta menos efectivo que la alfa-MO debido a un incremento en los niveles de putrescina. Su inhibición se reduce in vitro por fosfato de piridoxal (111) (Tabla 6.2).

La inhibición de este compuesto in vitro es dependiente de la concentración de fosfato de piridoxal siendo suprimida a altas concentraciones de la coenzima (25).

6.5 OTROS ANALOGOS DE ORNITINA

El análogo insaturado, trans-3-dehidroornitina, es un fuerte inhibidor competitivo y reversible de la ODC (31, 111). Recientemente Mamont et al reportaron que la DFMO es un inhibidor irreversible de la enzima en células hepáticas de rata. La actividad enzimática no se detecta en extractos de células dializadas después de tartarse con DFMO. La DFMO en una concentración 0.01mM impide casi totalmente la acumulación de putrescina y espermidina.

Se reportó que el DL-alfa-hidrazino-delta-benzilamino valerato causa alguna inhibición en el hígado pero la DL-eritro y DL-treo-beta-hidroxiornitina no tienen efecto (111) (Tabla 6.2).

Se observa en la figura 6.1 que muchos análogos de ornitina con excepción de alfa-vinilornitina son inhibidores efectivos de la ODC in vitro. La introducción de un doble enlace (3, 4-trans-deshidro ó Δ) en la cadena aumenta considerablemente las potencias de la DFMO y alfa-monofluorometilornitina (alfa-MFMO). No solamente se incrementa la afinidad de la enzima (con una Ki aparente baja) sino también su rápida inactivación (t_{1/2} de saturación y a una concentración 10 mol) especialmente en el caso de Δ-MFMO (113).

La DL-alfa-MFMO es un inhibidor irreversible de la ODC que actúa en el sitio catalítico de la enzima formándose un fuerte enlace covalente entre la enzima y el inhibidor (57).

El desarrollo de inhibidores específicos para las enzimas en las vías biosintéticas de poliaminas bacterianas no ha sido sencillo, particularmente en la identificación de inhibidores de las ornitinas descarboxilasas bacterianas. Se mostró previamente que la MFMO es un potente inhibidor irreversible de la ODC de hígado de rata pero no se ha probado contra una enzima de bacteria (57).

ESTRUCTURA	NOMBRE	K _i (μM)	t _{1/2} (min) a saturación	t _{1/2} (min) a 10 μM
	α-difluorometilornitina (DFMO)	19	3.1	15
	α-monofluorometilornitina (MFMO)	75	1.6	14
	Dehidro-α-difluorometilornitina (Δ-DFMO)	30	2.6	10
	Dehidro-α-monofluorometilornitina (Δ-MFMO)	27	2.6	3
	α-ornitina acetilénica	10	8.4	17
	α-vinilornitina	810	37.0	100
	α-monofluorometilputrescina	56	44.0	29
	α-difluorometilornitina	30	74.0	29
	α-trifluorometilputrescina			
	Dehidro-α-monofluorometilputrescina	43	6.3	1
	Dehidro-α-difluorometilputrescina	60	8.7	5
	α-putrescina acetilénica	23	9.7	14
	Putrescina dehidroacetilénica	16	3	5.5
	δ-putrescina metilacetilénica (MP)	13	1.8	4.1
	(R,R)-δ-putrescina metilacetilénica (R,R-MP)	3	1.7	2.2
	α-vinilputrescina	540	10.0	300.0

Fig. 6.1 Estructura y propiedades de análogos de ornitina y putrescina que inhiben la actividad de la ODC de manera tiempo-dependiente (113).

6.6 ANALOGOS DE PUTRESCINA

Entre los analogos de putrescina que inhiben a la ODC encontramos a los analogos alfa, beta insaturados y la 1,4 diaminobutanona (31, 111).

El 1,4 diamino-trans-buteno es un potente inhibidor competitivo de la enzima (3, 111) siendo menos potente el 1,4 diamino-2-butino. La inhibición producida por estos analogos es revertida por fosfato de piridoxal. Se piensa que los complejos formados entre las aminas y el fosfato de piridoxal podrian ser los inhibidores actuales (111) (Tabla 6.2).

Muchos analogos de putrescina se probaron como inhibidores potenciales de la ODC de *Aspergillus nidulans* pero solo la 1, 4 diaminobutanona inhibe fuertemente en una concentración de 1.3 mM.

La 1, 4 diaminobutanona es un inhibidor competitivo reversible de la ODC (31, 111) siendo más efectivo contra la ODC de *Aspergillus nidulans* y en menor grado contra la de *Escherichia coli*. Este inhibidor es inestable en solución (111).

En un intento para producir un inhibidor más estable se sintetizaron los derivados oxima y semicarbazona de la 1, 4 diaminobutanona los cuales poseen propiedades inhibitorias menores.

Se encontró que la 2-hidroxi-putrescina es también un inhibidor competitivo de la enzima de *Aspergillus nidulans* pero tiene un valor de K_i comparable con el de la putrescina (K_i 0.06 mM).

La 1, 4 diaminobutanona induce un incremento en la cantidad de ODC en conidia germinada de *Aspergillus nidulans* por estabilización de la enzima incrementando su vida media (111).

El trans-1, 4-diamino-2-butano es un inhibidor reversible de la ODC (31). Se ha sintetizado el analogo alfa-trifluorometilado el cual posee propiedades "inhibitorias suicidas", el compuesto alfa-vinilico es menos activo. Los analogos de putrescina, si bien son muy potentes in vitro, cuando se administran in vivo se convierten en analogos del ácido gama-aminobutirico (GABA).

La delta-metilacetilputrescina (MAP) es un potente inhibidor de la ODC como se indica por los valores bajos de los tres parametros cineticos (Figura 6.1). La MAP es una mezcla de cuatro diastereoisómeros, pero su actividad inhibidora sobre la ODC reside enteramente en el isómero RR. De aquí que la RR-MAP es, por el momento, el analogo de la putrescina más activo que haya sido sintetizado (113).

La DL-alfa-monofluorometilputrescina (DL-alfa-MFMP) un analogo de putrescina inhibe la ODC eucariótica y la ODC de *Escherichia coli*

teniendo un menor efecto inhibitor sobre la enzima de *Pseudomona aeruginosa* (57). Es obvio que los inhibidores efectivos en eucariotes no pueden ser usados para inhibir las enzimas bacterianas (57). El 5-hexino-1, 4-diamino y trans-hex-2-en-5-ina-1, 4 diamino son inhibidores irreversibles de la ODC (51).

6.7 N (5'-FOSFOPIRIDOXIL) ORNITINA

Todas las ornitinas descarboxilasas estudiadas utilizan como coenzima fosfato de piridoxal y probablemente se encuentre involucrada una base de Schiff intermediaria entre la ornitina y el fosfato de piridoxal.

Se ha investigado el uso de un aducto estable entre la ornitina y el fosfato de piridoxal como inhibidor potencial de la ODC sintetizándose la N(5'-fosfopiridoxil) ornitina que tiene un alto grado de especificidad para la ODC aunque no es absolutamente específica.

La cinética de inhibición de la ODC por N(5'-fosfopiridoxil) ornitina es compleja. Este inhibidor es no competitivo con respecto a la ornitina y al fosfato de piridoxal. Heller et al han sugerido que el inhibidor se une al sitio activo de la enzima normalmente ocupado por la ornitina y el fosfato de piridoxal (111).

Se han sintetizado varios N(5'-fosfopiridoxil) aminoácidos y se ha encontrado que la N(5'-fosfopiridoxil) ornitina inhibe frecuentemente a la ODC de hígado de rata. El grupo fosfato es esencial para la inhibición de la ODC (108).

6.8 INHIBIDORES QUE COMPITEN POR EL FOSFATO DE PIRIDOXAL

Los inhibidores menos específicos de la ODC son aquellos que combinados con fosfato de piridoxal previenen su funcionamiento como cofactor.

Podría esperarse que inhibieran una variedad de enzimas que requieran de fosfato de piridoxal y la especificidad dependerá de la fuerza con la que este unido al fosfato de piridoxal a la apenzima.

Algunos ejemplos de este tipo de inhibidores son la 4-bromo-hidroxibenziloxamina y el análogo de ornitina canalina. Si bien la canalina ($H_2NOCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$) aparece como un análogo de la ornitina, inhibe una variedad de transaminasas y descarboxilasas por la formación de un complejo entre la canalina y el fosfato de piridoxal.

La inhibición de ODC por canalina puede ser rápidamente revertida por fosfato de piridoxal. Rahiala et al sugirieron que

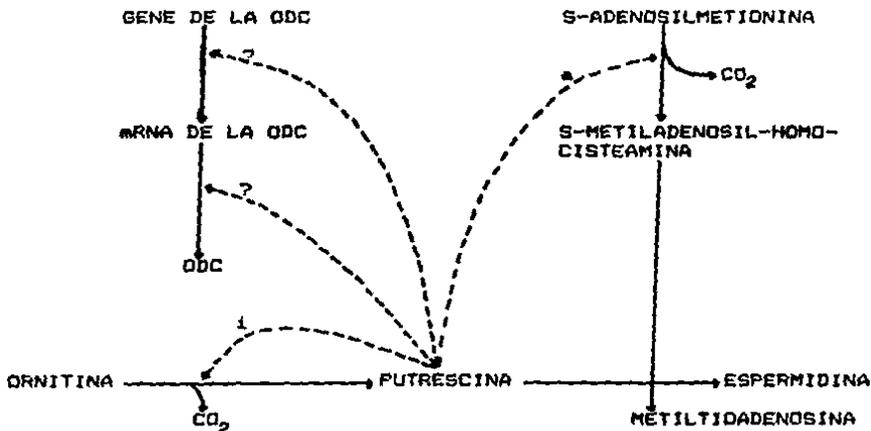
esto es debido a la rápida disociación de la haloenzima en el caso de la ODC (111).

Los antagonistas del fosfato de piridoxal (hidraza del ácido nicotínico y 4-bromo-3-hidroxibenziloxiamina) son potentes inhibidores no específicos de la ODC (114).

6.9 REPRESORES DE LA ODC

La putrescina juega un papel importante en el control de la biosíntesis de espermina y espermidina. Esta actúa en cuatro puntos o sitios en la regulación de la biosíntesis de espermina y espermidina (Figura 6.2):

- 1) Es un inhibidor competitivo de la ODC -esto probablemente no tiene importancia fisiológica.
- 2) Reprime la síntesis de ODC.
- 3) Activa a la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMd).
- 4) Es el sustrato para la síntesis de espermidina.



i= inhibidor, a= activador .

Fig. 6.2 Función de la putrescina en el control de la biosíntesis de espermidina (111).

Un análogo de putrescina que podría actuar en el sitio 2 pero no en el 4 sería utilizado en la reducción intracelular de la concentración de oligoaminas. Si se prepara para actuar en el sitio 4 como un sustrato para la espermidina sintetasa debería permitir la producción de análogos de espermidina los cuales podrían sustituirse in vivo. Si esto afecta sólo el sitio 2 en un alto grado entonces podría prevenir la producción de tri y tetraaminas. La diamina en cuestión podría entonces realizar algunas de las funciones de la putrescina.

Este tipo de inhibidor fue descubierto por Poso y Jane y llamado "repressor gratuito" que es la contraparte del inductor gratuito en los sistemas de enzimas inducibles como la isofeniltiogalactosida para la beta-galactosidasa (111) (Tabla 6.2).

Se encontró que el 1, 3 diaminopropano inyectado intraperitonealmente en ratas parcialmente hepatectomizadas suprime el incremento de ODC que ocurre normalmente durante los estados tempranos de la regeneración de hígado (61, 111).

La 1, 3 propanodiamina no afecta la actividad de la ODC cuando se mide in vitro e in vivo causa una reducción en la cantidad de proteína inmunoreactiva sugiriendo que la amina afecta la síntesis de ODC.

Algunas evidencias sugieren que la 1, 3 propanodiamina y putrescina previenen parcialmente el incremento en la actividad de la enzima y, de modo sorprendente, la cadaverina y la hexanodiamina suprimen su actividad completamente. Ninguna de estas aminas afecta la actividad de la ODC in vitro. Las inyecciones de 1, 2 diaminoetano, 1, 3 propanodiamina o putrescina en ratas previene un incremento en la ODC en próstata ventral y vesícula seminal seguido por una terapia de reemplazamiento hormonal.

La 1, 3 diaminopropano afecta la concentración intracelular de putrescina e inhibe la producción de ODC en células ováricas de cayo (111).

La 1, 3 propanodiamina y algunos de sus derivados son potentes inhibidores de la ODC de células de tumores ascíticos de Erlich en cultivo (60).

El 1,3 diamino-2-propanol es un derivado hidroxilado del diaminopropano (60) el cual inhibe directamente a la ODC (85). Este compuesto es superior al diaminopropano en muchos puntos importantes:

1) El diaminopropanol, un inhibidor de la ODC, es igual o más potente que el 1, 3 diaminopropano.

2) A diferencia del 1, 3 diaminopropano, el diaminopropanol no depende para su actividad de putrescina-adenosilmetionina descarboxilasa in vitro.

3) El diaminopropanol previene la acumulación de

poliaminas más rápidamente que el diaminopropano.

4) El diaminopropanol, a diferencia del diaminopropano, aparentemente no sobrepasa las funciones de las poliaminas como se considera por su infectividad de revertir los efectos antiproliferativos de la reducción de poliaminas (60). Si bien las diaminas podrían actuar como inhibidores competitivos débiles, su potente efecto inhibidor sobre la ODC es atribuible a un mecanismo indirecto de acción, posiblemente involucrando la liberación o síntesis de una proteína inhibidora de la ODC (31).

6.10 8-AZAQUANINA Y 5-AZACITIDINA

Estos compuestos inhiben a la ODC en eucariotes e impiden la síntesis de DNA a la vez que evitan la inducción en hígado regenerado (108).

6.11 1, 4 DIAMINOBUTINO

Se ha encontrado que el 1, 4 diamino-2-butano inhibe la ODC de hígado de rata. La inhibición es competitiva con una K_i de 2×10^{-6} M. Otro análogo es el 1, 4 diamino-2-butino que inhibe la ODC de fibroplastos (108).

6.12 POLIAMINAS

En concentraciones 1mM causan una inhibición del 40% de la ODC en intestino de rata y el cloruro de potasio inhibe la actividad de la enzima purificada en un 50% a 270 mM (108). Se ha demostrado que en células KB en crecimiento, en linfocitos, en hígado de rata regenerado y en células 3T3 que la putrescina y la espermidina tiene un efecto bloqueante sobre la inducción de la ODC.

La putrescina adicionada a células HTC en una concentración baja (10^{-5} M) causan un decremento en la actividad de la ODC.

En otros sistemas celulares se demostró que la putrescina es un inhibidor muy débil de la ODC de células HTC con una K_i de 2×10^{-3} M. Entonces es improbable que la putrescina 10^{-5} M exógena adicionada directamente inhiba la ODC intracelular (61).

El decremento en la actividad de la ODC en respuesta a la putrescina extracelular podría ser un mecanismo importante para la regulación endógena de la biosíntesis de poliaminas particularmente porque la putrescina es efectiva en concentraciones muy bajas (31).

Finalmente, la putrescina y la espermidina regulan intracelularmente a la ODC. El hecho de que la adición exógena de

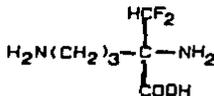
ornitina bloquea por si misma a la ODC, probablemente por conversión a poliaminas, podrian sugerir que este es el caso. También los niveles de putrescina estan correlacionados con la actividad de la ODC en varios puntos en el ciclo celular. La inducción de la enzima puede ocurrir cuando hay cantidades considerables de poliaminas presentes. Esto sugiere quizá que algunos niveles compartamentalizados de poliaminas pueden regular también a la ODC a nivel de su síntesis o control de su actividad catalítica via la inducción de una proteína inhibitoria (61).

6.13 DL-ALFA-DIFLUOROMETILORNITINA (DL-ALFA-DFMO)

Entre las sustancias que inhiben la biosíntesis de putrescina, una de las más estudiadas es la difluorometilornitina (DFMO).

La alfa-DFMO es un inhibidor de la ODC irreversible, específico, altamente selectivo del tipo suicida (3, 4, 7, 14, 24, 29, 48, 54, 56, 67, 74, 76).

La estructura de esta sustancia es la siguiente (111, 113):



Esta sustancia fue sintetizada por Bey, Metcalf y sus colegas como inhibidor que actúa por un mecanismo via suicida con la ODC (32).

En un principio tales inhibidores son altamente selectivos ya que requieren ser activados por la enzima para formar un intermediario electrofílico reactivo el cual se une covalentemente a un residuo nucleofílico dentro del sitio activo de la enzima (FIGURA 6.3). En la práctica la DFMO es un inhibidor selectivo e irreversible de la ODC, capaz de agotar las concentraciones celulares de poliaminas in vivo (82) y por esta razón se esta estudiando la función de las poliaminas en la fisiología celular (100) así como en procesos patológicos (82).

El razonamiento para la síntesis de DFMO como inhibidor potencial de la ODC fue que esta actuaría como sustrato para la enzima (31, 100). La inactivación de la enzima no ocurre directamente (31). Esta se da porque el inhibidor es descarboxilado por la enzima (31, 52) generando especies carbonónicas intermedias altamente reactivas (31, 52, 100) al perder un átomo de fluor (52, 100). Estas especies alquilan un sitio nucleofílico de la enzima (7, 31, 52, 100) (probablemente lisina) (52), cerca del sitio activo o en él (31), entonces la enzima se inactiva irreversiblemente

(31) al formarse un enlace covalente con el inhibidor (7).

Tal inactivación, por lo tanto, procede con el ataque estequiométrico de la DFMO a la enzima (52).

El mecanismo hipotético de la inactivación irreversible de la ODC por DFMO se representa en la figura 6.3 (82, 92, 110).

Después de la formación de una base de Schiff entre el inhibidor y el fosfato de piridoxal, cofactor en el sitio activo de la enzima ①, se pierde dióxido de carbono y hay eliminación de un átomo de fluor ②, esta reacción produce un intermediario altamente electrofílico que puede unirse a un residuo nucleofílico (Nu) del sitio activo, inactivando irreversiblemente a la enzima ③ (82, 92) (Figura 6.3).

La DL-alfa-DFMO inhibe la actividad de la ODC y consecuentemente la formación de putrescina en células eucarióticas (100). La ODC de eucariotes esta sujeta a una inhibición irreversible del tipo "suicida" por análogos fluorados y acetilados de la enzima sustrato ornitina y del producto de descarboxilación enzimática putrescina (51).

En estudios llevados a cabo en bacterias se ha observado que la DFMO es un inhibidor irreversible potente de la ODC en *Pseudomonas aeruginosa* (Ki 0.36mM) (37) tanto in vitro como in vivo pero no tiene efecto in vitro (56) sobre la enzima de *Escherichia coli* (Ki 0.30 mM) (37) o *Klebsiella pneumoniae* (56).

La DL-alfa-DFMO adicionada a un medio de crecimiento de células de *E. coli* previene la inducción normal de la actividad de la ODC de *E. coli* observada cuando las células entran en la fase exponencial de crecimiento.

Como se muestra en la figura 6.4 la vida media de la actividad de la enzima en *P. aeruginosa* graficada contra el recíproco de la concentración del inhibidor hace posible calcular la constante de disociación Ki (1400 μ M) y la vida media de la enzima activa a una concentración infinita de la DL-alfa-DFMO (un minuto); $t_{1/2}$ a una concentración 10 μ M del inhibidor fue de 130 minutos (56).

La alfa-DFMO penetra rápidamente dentro de las células cuando se administra a animales y no se metaboliza significativamente en otras vías. Por esta razón, la única macromolécula celular que se marca cuando se administra DFMO radiactiva es la ODC.

Si los animales son tratados con DFMO marcada fijando y lavando los tejidos para remover la droga puede utilizarse para la localización de la enzima. Si es posible que la entrada de DFMO dentro de algunas células ocurra ampliamente más que en otras esto podría producir un resultado artificial basado en el hecho de que la enzima se marca totalmente en células con una alta concentración de DFMO (48).

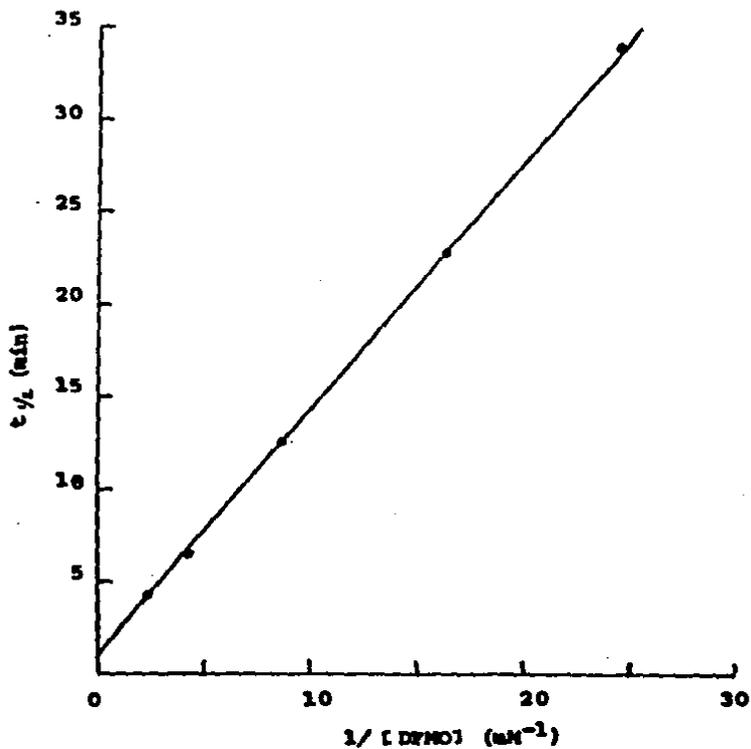


Fig. 6.4 Dependencia de la vida media de la ornitina descarboxilasa de *Ps. seuroginosa* sobre la concentración de DL- α -difluorometilornitina. (56).

Los efectos de la DFMO en varios sistemas celulares son revertidos por la adición de putrescina (100) la cual a la vez regula la aparente vida media tan corta de la ODC (77).

El uso de DFMO (Ki 39 μ M) permite la demostración de la función esencial de la ODC en varios procesos fundamentales que incluyen la regeneración de próstata inducida con testosterona y de la vesícula seminal de rata, el desarrollo de las etapas embrionarias en mamíferos, y la proliferación de células leucémicas (114).

Se ha demostrado que la DL-alfa-DFMO es un inhibidor irreversible efectivo de todas las ornitinas descarboxilasas eucarióticas estudiadas. Es eficaz contra la ODC extraída de *P. aeruginosa*, pero completamente ineficaz contra la enzima de *E. coli* (57).

La (\pm)-alfa-DFMO ha sido utilizada con éxito para estudiar los niveles celulares de poliaminas (25), inhibe eficazmente la acumulación de putrescina, espermina y espermidina inducidas en linfocitos estimulados y consecuentemente reduce la ruta de proliferación celular (85).

CAPITULO VII. IMPORTANCIA CLINICA Y PERSPECTIVAS TERAPEUTICAS

Las poliaminas participan en el control del crecimiento normal, lo que ha sido demostrado en varios sistemas (83) entre los que se pueden mencionar:

- 1) Crecimiento embrionario
- 2) Regeneración hepática
- 3) Hipertrofia renal
- 4) Hipertrofia cardíaca
- 5) Crecimiento inducido por andrógenos y estrógenos
- 6) Estimulación hormonal de varios tejidos
- 7) Cultivos de células cancerosas y,
- 8) Cánceres in vivo

También existen evidencias experimentales que sugieren que las poliaminas están íntimamente relacionadas en la regulación de la hipertrofia e hiperplasia celulares (26, 83).

El desarrollo de inhibidores específicos ha permitido bloquear la formación de poliaminas. La adición de un inhibidor a las células proliferantes no solamente reduce los niveles de poliaminas sino que también inhibe la proliferación celular. Esta inhibición se puede revertir utilizando concentraciones bajas de cualquiera de las tres poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) (83).

Esto se ha demostrado en varios sistemas proliferativos tales como (83):

- 1) Explantes de glándula mamaria cultivados
- 2) Linfocitos estimulados con concavalina A
- 3) Cultivo de embrio-fibroblastos de rata
- 4) Cultivos de células malignas de hígado de rata y,
- 5) El desarrollo del crecimiento de huevos fértiles de erizo de mar

7.1 EMBRIOGENESIS

Una elevación brusca de la actividad de la ODC uterina decidual, es una característica que se presenta en el periodo siguiente a la implantación, en la embriogénesis temprana en mamíferos (54).

La embriogénesis temprana en mamíferos es uno de los sistemas celulares de división y diferenciación más activos y se han descrito numerosos estudios del incremento de la actividad de la ODC asociada con este proceso (82).

Se ha obtenido evidencia directa de un papel esencial de esta enzima utilizando DL-alfa-DFMO.

Cuando se administra durante la gestación temprana, se detiene el desarrollo embrionario en el ratón, rata y conejo (16, 54). Los

principios empleados para la administración de la DFMO podrían generalizarse para otras especies de mamíferos.

La ODC tiene una vida media de solamente 10-20 minutos y aun con un inhibidor irreversible, es necesario mantener concentraciones adecuadas en el tejido para asegurar una inhibición continua de la enzima. En la práctica, la DFMO es rápidamente eliminada a través de la circulación ($t_{1/2} \sim 20$ min) y de la decidua del ratón. La administración repetida de la droga es necesaria si la inhibición continua de la enzima se logra (54).

Se han llevado a cabo algunos estudios en los primeros días de preñez en el útero de la rata y de la ratona. En la rata se ha observado que la actividad de ODC es baja hasta el día 3, disminuyendo el día 4 para elevarse nuevamente el día 5. La actividad es alta en el tejido decidualizado alrededor de los días 6 al 9, mientras que en el tejido no diferenciado del útero no hay actividad detectable en el día 6 y apenas cuantificable en los días 8 y 9. La actividad mínima presente antes del día 3, en esta enzima, así como en el tejido no decidualizado después de la implantación, no ha sido observada en otras enzimas uterinas estudiadas en estas condiciones experimentales. Sin embargo, la síntesis de RNA sigue un patrón similar al mostrado por la actividad de la ODC con incrementos en los días 3 y 5 y una elevación posterior en el día 6 que corresponde a tejido decidualizado con una disminución en el tejido no diferenciado.

En el útero total de la ratona, la actividad de la ODC permanece baja durante los primeros cinco días de gestación, pero se incrementa rápidamente entre los días 6 y 8 en el que alcanza un pico de concentración. La actividad declina significativamente alrededor de los días 9 y 10 (16).

Una dosis por vía oral al 2% de alfa-DFMO administrada en el periodo previo a la aparición de la actividad de la ODC impide el incremento de actividad de la enzima (16). La inhibición de la ODC durante el embarazo de la rata, detiene en su totalidad la embriogénesis. Esta inhibición es abolida si se administra putrescina, que es el producto de la reacción inhibida.

También es factible revertir el efecto inhibitorio de la embriogénesis administrando progesterona al animal de experimentación ya que induce la síntesis de ODC (10).

La implantación parece llevarse a cabo normalmente pero hay una detención temprana del desarrollo embrionario y una consecuente reabsorción ya que no se encuentran fetos desarrollados en el útero de ninguna de estas especies cuando se sacrifican 24 horas antes del parto (10, 16).

Así pues, se puede concluir que la ODC y las poliaminas junto con la síntesis de DNA, RNA y proteínas, están íntimamente relacionadas en la fase de crecimiento rápido asociado con el desarrollo embrionario temprano, lo que ofrece amplias perspectivas en la investigación en el campo de la reproducción,

permitiendo considerar tanto nuevos enfoques contraceptivos. Así como analizar los mecanismos moleculares de la diferenciación embrionaria cuya falla se reflejaría en alteraciones del desarrollo, muerte fetal y aborto (16).

En el útero de ratón, la actividad de la ODC comienza a incrementarse después de la implantación y alcanza un pico en el día 6 de la gestación (82).

No es sorprendente que se incrementen las concentraciones de putrescina y espermidina, pero ocurren cambios pequeños en los niveles de espermina durante este período (82). Se ha establecido que durante los días 5-8 de gestación se incrementa rápidamente la biosíntesis de putrescina (54).

El cambio bioquímico correspondiente al incremento repentino en el desarrollo embrionario asociado con la formación temprana de somita, el cual toma lugar en el ratón de 7 a 8 días.

Los efectos del tratamiento con DFMO durante los días 5-8 de la gestación (54, 82) fueron inequívocos (82). Los incrementos en la actividad de la ODC y las concentraciones de putrescina y espermidina fueron suprimidas y suspendido el avance del desarrollo embrionario más allá del séptimo día. El embrión subsecuentemente se reabsorbe o pierde del útero.

Estos efectos de la DFMO pueden ser completamente revertidos por la administración concomitante de putrescina implicando la inhibición de la biosíntesis de la misma como el mecanismo del efecto contragestional (82). La DFMO también inhibe el desarrollo embrionario temprano en ratas y conejos. Entonces, una elevación en la actividad de la ODC conduce a un aumento en la concentración de putrescina, el cual parece ser absolutamente esencial durante el período crítico después de la implantación, para continuar el crecimiento embrional de mamíferos (82) (Tabla 7.1)

El período crítico de gestación murina identificado como susceptible para la inhibición por DFMO, cubre las etapas estándar de 8 a 16 días del desarrollo embrionario de mamíferos.

Extrapolando del ratón, se administró DFMO, vía el agua para beber, para ratas y conejos durante etapas estándar del desarrollo. En cada caso se obtuvo la detención completa del desarrollo embrionario. Entonces, los principios fundamentales del método de interrupción de la preñez en el ratón generaliza por los menos otras dos especies. Esta por determinarse si esto se lleva a cabo en aquellas especies donde las etapas se amplían a períodos más largos (54).

TABLA 7.1

EFFECTOS CONTRACTIONS DE LA DPMO EN LOS RATONES

TRATAMIENTO DURANTE LOS DIAS 5-8	DOSES DE DPMO (mg/kg por 24 hr)	EFECTOS POR RA TCM	MODULOS DE REBORSO CION POR RATON	NUMERO DE RA- TONES
Control En agua de consumo diario	0	10.0 ^a ± 1.0	3.4 ^a ± 0.7	17
0.125%	2592	7.2 ^a ± 1.4 ^b	3.5 ^a ± 0.9 ^b	6
0.5%	9892	2.0 ^a ± 1.0 ^b	10.4 ^a ± 1.5 ^b	7
2.0%	39702			19
Por inyección cada 6 horas	200	5.5 ^a ± 1.5 ^b	8.8 ^a ± 1.5 ^b	8
50 mg/kg	800			10
200 mg/kg				

a Basado en un peso corporal promedio de 40 gramos.

b Significativamente diferente del valor control, p < 0.05

(54)

7.2 CANCER Y TUMORES

En este apartado se hablará de los diferentes tipos de cáncer donde ha sido estudiada la actividad de la ODC así como sus posibles tratamientos.

7.2.1 POLIAMINAS EN EL TRATAMIENTO DE LA PROSTATITIS

Desde 1971, se señaló la posible relación de los niveles de poliaminas en orina con tumores humanos. A partir de entonces, se han realizado varios trabajos acerca de los niveles elevados de poliaminas en diferentes entidades clínicas, y particularmente en pacientes con cáncer. Se ha demostrado también la disminución de dichos niveles después de tratamientos exitosos de algunos tipos de cáncer, con inhibidores específicos de la biosíntesis de poliaminas (91).

Un ejemplo es el cáncer de próstata, que está considerado como una causa de alta incidencia de mortalidad. El hecho de que altas concentraciones de poliaminas en el cuerpo humano se encuentren en la próstata ha despertado gran interés por conocer su participación en los procesos normales y patológicos de esta glándula.

Con base en las observaciones anteriores y en el hecho de que también se encuentran altas concentraciones de poliaminas en la orina de pacientes con otras enfermedades, se ha estudiado la relación entre el carcinoma de próstata y la excreción de poliaminas, encontrándose niveles más elevados en pacientes con cáncer de grado II o mayor (9, 91).

Estos hallazgos condujeron a estudiar la biosíntesis de poliaminas en pacientes con prostatitis.

Dunzendorfer y Russell estudiaron la biosíntesis de poliaminas en pacientes con prostatitis, además de basarse en las observaciones de que la DFMO disminuye el aumento de peso de la próstata ventral de la rata y de las vesículas seminales, durante el crecimiento de las ratas (7, 67).

Asimismo, estudiaron la inhibición de la ODC por DFMO en pacientes con prostatitis no supurativa crónica. Estos resultados mostraron una respuesta clínica parcial con desaparición de la hematosperrina después de la administración de 18 g de DFMO/día (LD₅₀ 5g/kg de peso) cuando se administró oralmente por un mes (7, 67, 91). Algunos parámetros bioquímicos tales como gama glutamiltransferasa, hormona luteinizante (LH), testosterona en semen, así como vitalidad y movilidad espermática, mostraron cambios importantes en pacientes tratados con DFMO, incluyendo un efecto significativo sobre la actividad de la próstata.

Durante el periodo de tratamiento con la DFMO se observó una disminución en el tamaño de la próstata. Solamente en 2 de 20 pacientes, se detectó una reducción del hematocrito y de la hemoglobina, que fue revertida después de 2 meses de suspensión de la terapia.

Las observaciones anteriores sugieren también que la determinación de los niveles de poliaminas en la orina puede ser una prueba útil para la detección de la malignización de la próstata en una etapa potencialmente curable (7, 67, 91).

7.2.2 ACTIVIDAD DE LA ODC COMO UN COMPONENTE ESENCIAL EN LA PROMOCION DE TUMORES

La formación de un tumor de piel en ratón es rápidamente dividida en 2 componentes que son llamados iniciación y promoción. La iniciación es acompañada por el tratamiento de la piel con un carcinógeno en una dosis lo suficientemente baja, que desarrolla tumores, sólo raramente, durante la vida de los animales. La piel tratada parece contener algunas células que son alteradas irreversiblemente, de modo que la aplicación de un segundo agente podría lograr muchos tumores, ambos benignos y malignos. El segundo agente tiene la capacidad única de lograr tumores en piel pero no es un carcinógeno efectivo cuando se aplica a la piel de ratón. El segundo agente, llamado agente promotor, es ejemplificado mejor por el diterpeno 12-*o*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), el cual fue aislado del aceite de crotón. El TPA promueve tumores de piel en ratón cuando se aplica 12 veces semanalmente, en la piel de ratones, en el rango de dosis de 1 a 10 nmol por 0.2 ml de acetona, dependiendo de la naturaleza genética de los ratones. Esto causa respuestas en cultivos de células en niveles de 10^7 a 10^{10} nm.

La primera evidencia de la inducción de la ODC por TPA y la elevación resultante de la putrescina y espermidina, quizás como un componente esencial del proceso de formación de un tumor fue reportada por O'Brien et al. El TPA induce la actividad de la ODC, tanto como, 300 veces en 5 horas, después de la dosis de TPA.

El tratamiento de la piel de ratón con agentes carcinogénicos y promotores de tumores, inducen la actividad de la ODC. A fin de determinar la relevancia de la inducción del mecanismo de la formación del tumor en la piel, se han realizado varios experimentos. Estos incluyen la determinación del efecto de un número de protocolos experimentales sobre la inducción de la enzima, el nivel de sus productos en el tejido, y la incidencia a tumores. Las variables incorporadas dentro de los protocolos incluyen:

- 1) La estructura del agente responsable para la obtención de tumores.
- 2) La dosis del agente.

2) El efecto de las sustancias capaces de modificar la inducción de la enzima y la incidencia de tumores.

Los más recientes incluyen los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, retinoides, ciertas poliaminas, y alfa-DFMO. En todos los casos, las alteraciones en la actividad de la ODC y el nivel de putrescina en la piel son alteraciones paralelas en la incidencia del tumor.

Esto concluye que los niveles elevados de la ODC y/o su producto putrescina o sus metabolitos juegan un papel esencial en la promoción de tumores, excluyendo la síntesis de putrescina, en respuesta al tratamiento con un promotor de tumor inhibiendo la formación del mismo. La especificidad de la alfa-DFMO para la inhibición de la actividad de la ODC y su habilidad para inhibir la promoción del tumor bajo protocolos idénticos, proporciona evidencias muy fuertes para apoyar esta conclusión.

La inhibición de la inducción de la ODC es dependiente de la cantidad de DFMO aplicada a la piel de ratón una hora antes del tratamiento con TPA. Una dosis tan baja como 0.046 mol de DFMO causa la inhibición, y la cantidad inhibida del 59 y 90% por 0.137 μ mol y 1.37 μ mol, respectivamente, cuando se aplica en 0.2% de una mezcla de solvente. Además una reducción en ambos niveles basales e inducidos de putrescina en la epidermis, ocurren después del tratamiento con DFMO (94).

7.2.3 INHIBICION DEL CRECIMIENTO TUMORAL

Siguiendo la observación de que la DFMO inhibe fuertemente el crecimiento de células tumorales L 1210 en cultivo (32, 82), Prakash et al probaron los efectos de este inhibidor en los ratones sobrevivientes inoculados intraperitonealmente con células leucémicas L 1210. La inyección intraperitoneal de 200 mg/kg de DFMO cada 6 horas, incrementa la sobrevivencia de 7.6 a 9.3 días, un resultado impresionante en este crecimiento vigoroso del tumor cuya virulencia, es un desafío terapéutico para cualquier régimen. El tratamiento con DFMO reduce la elevación de la actividad de la DFMO en los bazo de ratones infectados por 75% y las concentraciones más bajas de putrescina y espermidina.

Marcados efectos antitumorales fueron subsecuentemente demostrados contra el sarcoma mamario murino EMT6, durante la administración de DFMO en una solución al 3% en agua de consumo normal. La respuesta fue equivalente a la que se obtuvo con 4 inyecciones semanales de ciclofosfamida, 100 mg/kg., y se asoció otra vez con la inhibición de la ODC tumoral y la disminución de putrescina y espermidina. Un aspecto significativo, fue la reversión completa de los efectos antiproliferativos de la DFMO y la deficiencia de la putrescina y espermidina intracelular por la administración de 1, 1'-(metil etanodilideno-dinitrilo): bis (3-aminoguanidina), un inhibidor de la diaminooxidasa y la 5-adenosilmetionina descarboxilasa. Esta observación implica la

reduccion de las poliaminas como parte del efecto inhibitorio sobre el crecimiento del tumor.

En otros experimentos, los efectos antitumorales sustanciales se obtuvieron contra los tumores mamarios (7B, 82) inducidos por 7, 12 dimetilbenz(alfa)antraceno (DMBA). En ratas tratadas con DMBA en el dia 50 de vida, los tumores comenzaron a aparecer despues de 50-60 dias y todas las ratas tuvieron tumores despues de 105 dias.

El tratamiento iniciado 30 dias despues del DMBA con DFMO al 2% en el agua de consumo diario, marcan lentamente la aparicion de tumores y, a pesar de la suspension del tratamiento de la DFMO antes de la autopsia, reduce casi a la mitad el promedio de tumores.

Estudios más recientes se han concentrado a la acción antitumoral de la ODC administrada en combinación con los agentes antitumorales establecidos. Cuando la DFMO se combina con adriamicina o vindesina contra celulas leucémicas L 1210, carcinoma mamario murino EMT6 y el hepatoma de Morris 7288 C en ratas y con ciclofosfamida contra EMT6 y el cáncer mamario inducido por DMBA (32, 82), se observa un efecto de potenciación.

Los efectos antitumorales de la DFMO han sido obtenidos sin ninguna toxicidad. Esto significa claramente que por la inhibición de la biosíntesis de poliaminas, el tratamiento con DFMO disminuye el crecimiento del tumor efectivamente y sin la acción tóxica de otras drogas antitumorales (82).

Los efectos inhibidores de la DFMO, son compatibles con los efectos de la droga sobre varias líneas celulares cancerosas y tumores sólidos. Ha sido demostrado que la DFMO potencia la acción de otras drogas tales como cisplatina, adriamicina, 1, 3-bis-(2-cloropetil)-1-nitrosourea e interferon en líneas de roedores y cáncer humano.

Se ha obtenido información de la eficacia relativa de 5 antiestrógenos que son drogas potencialmente útiles en el tratamiento de cáncer mamario humano. Los efectos inhibitorios de estos compuestos en celulas MCF-7 están en el siguiente orden: Keoxifeno > trioxifeno > LY117018 > HO-7am > tamoxifeno > HO-Tam > hidroxitamoxifeno (78).

7.2.4 LA ODC COMO INDICADOR DEL GRADO DE MALIGNIDAD DE TEJIDOS NEOPLASTICOS HUMANOS

Se ha determinado la conexión entre las poliaminas y el cáncer humano, en particular, para el uso de los niveles de actividad de la descarboxilasa que biosintetiza a las poliaminas, ODC, como indicadores de la ruta de crecimiento y consecuentemente de la maligniencia de algunos tipos de neoplasias humanas.

En 1971, Fusell y Bremer demostraron una excreción diaria elevada de poliaminas por pacientes con cáncer o por pacientes con distinuria. Esto inmediatamente enfatizó que no es posible considerar un incremento en la eliminación urinaria de poliaminas, como un hecho bioquímico característico del estado de neoplasia.

Otras numerosas observaciones han confirmado la elevación del contenido de poliaminas en las orinas de pacientes con malignancia y de pacientes con una variedad de enfermedades como por ejemplo psoriasis, fibrosis quística, lupus eritematoso sistémico, algunos errores innatos del metabolismo de aminoácidos, infecciones, anemia perniciosa y hemolítica.

Se midieron los niveles de actividad de la PBD en diferentes tipos de tejidos primarios neoplásticos humanos. El incremento de las actividades de la PBD, especialmente de la ODC, han sido observados frecuentemente en la oncología experimental. De manera adicional, investigaciones con hepatomas de rata con diferente velocidad de crecimiento y durante la carcinogénesis química en la piel de ratón, han indicado que el grado de aumento de la ODC, podría utilizarse como indicador bioquímico de la actividad de crecimiento neoplástico.

Lo más real de los datos presentados son las diferencias en los niveles de actividad de la PBD en varios tipos de tumores. En detalle, el grado de aumento en la actividad de la ODC correlaciona bien con la ruta del crecimiento neoplástico, ya que entre los epitelomas cutáneos es más grande en carcinomas celulares escamosos que en los epitelomas celulares basales (Tabla 7.2).

La magnitud de la elevación en la actividad de la ODC del sistema nervioso central relacionado con los tumores es proporcional a la malignidad. En efecto, los niveles de actividad de la ODC son más grandes en el grupo de astrocitomas diferenciados (por ejemplo astrocitomas de grado 3 y 4, astrocitoma y glioblastoma multiforme) que en el grupo de astrocitomas diferenciados (por ejemplo astrocitomas de grados 1 y 2). Lo mismo es válido para los meningiomas, entre los cuales las formas típicas tienen una actividad más baja de la ODC que en las formas no típicas. El espongioma blastoma polar, el cual generalmente crece como tumor intracraneal, muestra la actividad de ODC más baja entre los tumores cerebrales. Al contrario, los meduloblastomas, tumores del cerebro altamente malignos, muestran la actividad más alta de ODC de todos los tumores restantes del sistema nervioso central estudiados.

En la parte C de la tabla 7.2 se puede observar, la disminución dramática en la actividad de la ODC en leucocitos tomados de paciente con leucemia mieloide crónica, después de una quimioterapia exitosa.

Se muestra que el grado de actividad de la ODC correlaciona con el grado de malignidad, en diferentes tipos de tumor humano, aún

TABLA 7.2

NIVELES DE LA ACTIVIDAD DE LA ODC EN VARIOS TIPOS DE TUMOR HUMANO

TUMORES	ACTIVIDAD DE LA ODC (pmol de CO ₂ /mg de proteína/30 min.)	
A) EPITELIOMAS CUTANEOS		
Epitelioma celular basal	3.5 [±] 0.8	(7)
Carcinoma celular escamoso	22.4 [±] 3.7 P < .001	(7)
B) TUMORES DEL SNC		
Esoangioblastoma polar	1.2 [±] 0.29	(4)
Astrocitomas diferenciados (grado 1 & 2)	4.5 [±] 1.28	(8)
Astrocitomas dediferencia- dos (grados 3 & 4)GMB	30.3 [±] 4.93 P < .001	(8)
Meduloblastoma	42.0 [±] 9.49	(3)
Meningioma típico	6.1 [±] 0.12	(4)
Meningioma atípico	14.7 [±] 2.78 P < .05	(4)
C) LEUCOCITOS LEUCENICOS (CML)		
sin tratamiento	2.90 [±] 0.13	(4)
Después de la terapia	DMM	(4)

Los resultados se expresan como valores promedio [±] error estándar.
El número de pacientes se indica en paréntesis.
SNC = Sistema Nervioso Central; GMB = Glioblastoma Multiforme;
CML = Leucemia Mielóide Crónica.
La significancia estadística se evaluó por la prueba de t de Student
DMM = Detectable pero no Medible.

(33)

cuando tienen diferentes orígenes genéticos.

Se considera que se puede utilizar el grado de elevación en la actividad de la ODC como un indicador de la ruta de crecimiento neoplásico, lo cual significa el grado de malignidad del tumor (33).

Finalmente, cuando se compara la confiabilidad de las determinaciones del contenido de poliaminas con las determinaciones de los niveles de ODC como herramientas de diagnóstico y pronóstico en las diferentes áreas de la oncología clínica, se tienen las siguientes observaciones (33):

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

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

7.2.5 QUIMIOTERAPIA DEL CANCER

La iniciación del crecimiento celular en mamíferos tanto in vivo como in vitro es acompañada por un incremento en la actividad de las enzimas biosintéticas de las poliaminas y en las concentraciones de las poliaminas.

Si la biosíntesis de poliaminas se detiene o interrumpe, el crecimiento también se detiene o es lento, y en algunas circunstancias ocurre muerte celular. Porque las células neoplásicas crecen más rápido que sus contrapartes normales las vías biosintéticas de las poliaminas son "blancos" obvios para la terapia del cáncer (79).

El posible uso de la DFMD como agente quimioterapéutico contra el cáncer (74) y los inhibidores de ODC relacionados como agentes anticáncer fueron revisados por Sjoerdesma & Schechter y Janna et al. La acción antiproliferativa de la DFMD sugiere que podría ser efectiva en el crecimiento lento del tumor, lo que ha sido demostrado en modelos experimentales. No obstante, la falta de los efectos citotóxicos, también implica que es poco probable que sea clínicamente efectiva y este parece ser el caso.

Desafortunadamente esto se aplica aún para estos tumores tales como pequeñas células de carcinoma de pulmón, en las cuales se encuentra que la DFMD es citotóxica (7).

En algunos modelos in vivo y in vitro en los cuales se han estudiado las concentraciones de las poliaminas, la DFMD causa poca o ninguna citotoxicidad: el crecimiento es inhibido o interrumpido mientras las células continúan viables.

Sin embargo, la DFMD es citotóxica para carcinoma humano de células pequeñas, células tumorales de rata 9L y mieloma murino R16 (79).

Aunque es posible que los inhibidores más potentes de la GDC tales como (2R, 5R)MAP, los cuales son más efectivos como agentes antitumorales en modelos animales, podrían también ser más activos en el tratamiento de neoplasmas humanos.

A un nivel simple es posible utilizar los inhibidores de la GDC para prevenir o retardar la ruta del crecimiento del tumor entre las dosis de la terapia con radiación u otros agentes quimioterapéuticos más tóxicos.

Se sugirió que la preparación de la combinación de DFMD seguida por la administración de MGBG podría aumentar la actividad antitumoral de la MGBG, por su incrementado consumo celular. El mayor problema que se tiene con el MGBG como un agente antitumoral es su toxicidad.

Se ha sugerido que podría tener efectos quimioterapéuticos benéficos, la combinación de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas con agentes antineoplásicos, los cuales se unen al DNA. Sin embargo, se debe ser cuidadoso en la selección de estos agentes aún cuando el pretratamiento con DFMD reduce la sensibilidad a ciertas drogas, incluyendo cis-platino. Este descenso se correlaciona con una declinación en el número de entrecruzamiento con platino. Estos resultados enfatizan que la reducción de poliaminas podrían originar cambios significativos en la cromatina y la estructura del DNA y que los efectos de estos cambios podrían ser complejos (7).

7.3 PSORIASIS

La psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica, pocas veces aguda, de causa desconocida, recurrente, no contagiosa, evoluciona en brotes separados por periodos de remisión total o de franca mejoría y constituida por placas eritemato escamosas en diferentes partes de la piel (89, 90).

La topografía de las lesiones de la psoriasis es variada (90) y los sitios de predilección son las salientes óseas (89), cara extensora de extremidades, rodillas y la piel cabelluda así como la región sacrocoxígea (89, 90). Las lesiones elementales son eritema y escama, siempre combinadas y formando placas de diverso tamaño y forma. Por lo general las placas son bien limitadas y la escama es muy blanca, de aspecto yesoso y gruesa. Otras veces no

es tan abundante y descubre el eritema subyacente (90).

El diagnóstico de la psoriasis es generalmente sencillo por la morfología tan típica de las lesiones pero en ocasiones es necesaria la ayuda de la histopatología (89, 90).

Aunque la duración precisa del ciclo celular psoriático todavía está en discusión, no hay duda que hay un gran número de células proliferando dentro de la lesión de la epidermis. Entonces, esto es razonable para especular que las poliaminas podrían estar involucradas en la proliferación de células lesionadas.

En 1975, Proctor et al reportaron que los niveles de espermidina y espermina son más altos en la sangre de sujetos con psoriasis que en los sujetos control. Asimismo encontraron que los niveles de espermina y espermidina en biopsias de piel en pacientes con psoriasis fueron más bajas que en biopsias de sujetos control. Se espera un contenido elevado de poliaminas en sangre de pacientes con psoriasis que las que se encuentran en pacientes control.

En un intento para resolver esta discrepancia (un contenido más bien bajo que alto de poliaminas en la piel de pacientes con psoriasis), se propuso la medición de los niveles de poliaminas y las actividades de las enzimas biosintéticas de las mismas en epidermis involucrada y no involucrada de pacientes con psoriasis y en epidermis normal. Se midió también el contenido de poliaminas en orina pero no en sangre encontrándose los siguientes niveles de poliaminas (putrescina, espermina y espermidina):

- 1) Más altos en la epidermis afectada que la no afectada de paciente con psoriasis.
- 2) Más altos en epidermis afectada de pacientes con psoriasis que en la epidermis normal.
- 3) Más altos en la orina de pacientes con psoriasis que en orina de sujetos control.

La actividad de DDC es 6 veces más grande en epidermis involucrada que en la no involucrada de pacientes con psoriasis o epidermis normal.

Después de 24 horas de un pretratamiento de un glucocorticoide de interés actual (0.05% de crema de diacetato de difluorasona) en lesiones psoriáticas in vivo, la actividad de la DDC fue marcadamente inhibida.

La alfa-MO es un inhibidor conocido de la actividad de la DDC de fuentes no cutáneas. Se ha demostrado que la alfa-MO inhibe la actividad de la enzima cuando la ruta de esta es vía lesión de epidermis psoriática.

Agentes similares podrían reducir los niveles de poliaminas en lesiones psoriáticas si la absorción percutánea pudiera lograrse (83).

En 1976, Bohlen et al reportaron que las concentraciones de las 3

poliaminas son significativamente elevadas en lesiones de la piel con psoriasis cuando se compara con la piel de sujetos control (83, 84), cuando se tratan los pacientes con psoriasis con aplicaciones de ditranol (0.05-0.3% junto con 10% de ácido salicílico en petróleo) durante 25 a 40 días. Las poliaminas se determinaron por cromatografía de líquidos, en los supernatantes de biopsias de piel homogeneizadas, sobre un analizador altamente sensible de aminoácidos (84).

En los estudios anteriores, los niveles de las tres poliaminas son elevados en las lesiones de psoriasis en comparación con los niveles en la piel normal demostrando que la formación de poliaminas se incrementa en las lesiones psoriáticas (83).

La potencialidad terapéutica de la farmacología de las poliaminas en la psoriasis es obvia. Experimentos en sistemas celulares básicos, muestran que si se reducen los niveles de poliaminas marcadamente, la proliferación celular es lenta. En la psoriasis, los inhibidores de la formación de las poliaminas podrían considerarse para un uso experimental nuevo.

Se ha mostrado recientemente que los retinoides orales se han utilizado para aliviar la psoriasis, pero su mecanismo de acción es desconocido. Sin embargo, es claro que los retinoides inhiben marcadamente la producción de poliaminas posiblemente por un mecanismo parecido al de una hormona esteroide, que bloquea la expresión del gen de la ODC. Es interesante conocer esto, si el efecto benéfico de los retinoides orales en psoriasis podría estar relacionado con la habilidad de los retinoides para inhibir la formación de las poliaminas en las lesiones (83).

Asimismo se ha utilizado clínicamente la DFMO en el tratamiento de la psoriasis (74).

7.4 INFECCIONES

En este apartado se hablará de diferentes enfermedades parasitarias y sus posibles tratamientos.

7.4.1 TRIPANOSOMIASIS

El *Trypanosoma brucei brucei* es un protozoario del orden cinetoplastida, los cuales se caracterizan por la presencia de un cinetoplasto, una región de la mitocondria que contiene DNA y se localiza cerca de la base del flagelo. *T. b. brucei* causa tripanosomiasis bovina (Nagana) en ganado, y los organismos relacionados *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense*, causan la enfermedad del sueño en el hombre (7, 23, 53).

En sus huéspedes mamíferos, estos parásitos viven en la sangre y linfa tan bien como en otros tejidos del cuerpo donde se dividen

por fisión binaria. La transmisión de la enfermedad involucra un insecto vector, la mosca tsé-tsé.

Bacchi et al iniciaron estudios experimentales con DFMO en tripanosomiasis (23, 113) culminados en el descubrimiento de un efecto curativo dramático de la DFMO en ratones infectados con una cepa virulenta de *T. b. brucei*. Bacchi et al desarrollaron una serie de evidencias de las funciones importantes para las poliaminas en tripanosomas y en el mecanismo de acción de varias drogas tripanocidas (113).

Se infectaron ratones con 5×10^6 de *T. b. brucei* con 24 horas de anticipación y tratados con DFMO que incluye en el agua de consumo diario que se les administra, pueden ser curados completamente, mientras que los ratones no tratados murieron 5 días después de la infección. A aquellos a los que se les dió una solución al 1 o 2% de DFMO en el agua de consumo diario, se curaron totalmente (23, 82, 113). Los parásitos desaparecieron de la sangre 5 días después que comenzó el tratamiento y los frotis de sangre tomados 30 días después de muertos los controles, fueron negativos (Tabla 7.3).

Como se indica en los resultados de la tabla 7.3, se tienen las siguientes evidencias (113):

1) Una respuesta dosis-dependiente de DFMO en este modelo, con animales recibiendo la droga como una solución al 1 ó 2% en el agua de consumo diario, llegan a estar desprovistos de parásitos dentro de los 5 días de que se comienza el tratamiento y permanecen desprovistos de éstos por más de 30 días.

2) Evidencia farmacológica de que la acción curativa de DFMO se debe a la inhibición específica de la ODC de tripanosomas y la reducción de los productos de aminas en los parásitos. Esta evidencia es proporcionada por el hecho de que los animales infectados a los que se les administra espermina, esperidina o putrescina junto con 1 ó 2% de DFMO retienen la infección y eventualmente mueren mientras que compuestos más grandes y homólogos de putrescina no tiene efecto.

3) Basados en la evidencia de que varios tripanosomas operan por la vía de un mecanismo de poliaminas y que sus acciones son intensificadas por la DFMO.

Los efectos benéficos de la DFMO se revierten por la administración concomitante de putrescina, implicando la inhibición de la biosíntesis de poliaminas como el factor crítico en la respuesta biológica (82).

La DFMO actúa en los tripanosomas bloqueando a la ODC y la biosíntesis de poliaminas es apoyada por estudio *in vivo* sobre la síntesis de putrescina de L-(3-³H)-ornitina.

Este tipo de experimento *in vitro* muestra que la DFMO añadida al medio de tripanosomas intactos en suspensión bloquean la

TABLA 7.3

EFFECTOS DE LA DFMO SOBRE INFECCIONES DE TRYPANOSOMA
BRUCEI BRUCEI EN RATONES

DRUGA, REGIMEN DE TRATAMIENTO	DOSIS TOTAL DE DFMO (mg)	SOBREVIVEN- CIA PROME- DIO (dias)
Sin droga	0	0
DFMO ^a		
2.0%, 6 dias	600	30
2.0%, 3 dias	300	30
1.0%, 6 dias	300	30
1.0%, 3 dias	150	30
0.75%, 3 dias	112.5	22.6
0.5%, 3 dias	75	4.0
0.5%, 3 dias ^b	75 ^b	28.6 ^b
0.25%, 3 dias	37.5	2.5
0.1%, 3 dias	15	0
0.1%, 3 dias ^b	15 ^b	2 ^b
2.0%, 3 dias		
+ Espermina· 4 HCl, 50mg/kg	300	7.7
+ Spermidina· 3HCl, 100 mg/kg	300	14.1
+ Putrescina· 2HCl, 500 mg/kg	300	13.4
SEMENTIL		
3 dias, 2.5 mg/kg ^b	0.2 ^b	30 ^b

a La droga se administró en el agua de consumo diario.

(53)

b Referencia 23

biosíntesis de putrescina. Además se encontró que la droga en 10^{-25} M bloquea la formación de putrescina de (3H)-ornitina por más del 50% en extractos crudos de *T. b. brucei*.

Los ratones a los que se les dio putrescina, espermidina o espermina durante el curso de la infección y tratados con DFMO sobrevivieron solamente de 10 a 14 días más que los controles y eventualmente murieron.

Finalmente, como el tratamiento con DFMO causa una reducción gradual en la parasitemia antes del aclaramiento final de la sangre en los primeros 5 días. Esto parece consistente con un mecanismo total de acción que involucra la detención de la replicación celular antes de la citotoxicidad parasitaria (23).

La naturaleza no tóxica de la DFMO y el éxito de la administración oral sin precedentes en la quimioterapia de tripanosomas, aumenta el optimismo para la utilización de este compuesto en algunas formas de tripanosomiasis en animales y humanos (62).

Se ha encontrado que la DFMO es un agente efectivo en el tratamiento de enfermedades del sueño en humanos, causado por tripanosomas *Africanus*, y es activo aun en los casos de tripanosomiasis melarsopial-resistentes fatales de fase tardía.

La ODC de *T. b. brucei* no es mas sensible a la DFMO (K_i de $139 \mu M$) que la ODC de las células de mamíferos. La DFMO entra a los parásitos por difusión pasiva, de manera no hay consumo selectivo de la droga. Hay un gran decremento en la ruta de síntesis del ácido nucleico en el *T. b. brucei* tratado con DFMO y la reducción de poliaminas induce cambios morfológicos de formas alargadas a formas cortas con núcleos múltiples y cinetoplastos. Estos cambios son consistentes con la idea de que los tripanosomas requieren poliaminas para la replicación celular normal. Esto muestra que el sistema inmune puede matar a los parásitos cuando su replicación es lenta por la reducción de poliaminas.

Se ha sugerido otro posible sitio de acción, por los recientes descubrimientos de que los tripanosomas contienen una glutatión reductasa, la cual requiere un cofactor conteniendo espermidina para su actividad. Este cofactor, llamado tripanotionina, ha sido purificado del insecto tripanosoma *Crithidia fasciculata*, y ha sido identificado como N^1, N^8 -bis(L- γ -glutamil-L-hemicistidinil-glicil)espermidina. La síntesis de este cofactor podría bloquearse en células en las cuales se reduce la espermidina. Sin embargo, esto no puede ser puesto que la tripanotionina no está presente en *Eimeria tenella*, cuyo crecimiento es fuertemente inhibido por DFMO (7).

7.4.1.1 TRIPANOSOMA BRUCEI RHODESIENSE

Otra demostración de los efectos de la ODC sobre las infecciones

tripanosomales en ratones se efectuó utilizando a *T. b. rhodesiense* de animales y del hombre. La cepa wellcome CT de *T. b. rhodesiense* es 100% letal para ratones no inmunizados dentro de los 5 días de infección por 1000 tripanosomas.

Para estudiar los efectos de la DFMO, cuatro grupos de 5 ratones hembra, recibieron 1000 tripanosomas cada uno. Los grupos recibieron 2%, 1% y 0.5% de DFMO en el agua de consumo diario, comenzando en el día de infección. El grupo control no recibió nada. Como el ratón control comenzó a morir al cuarto día, se buscó la presencia de parásitos en la sangre residual del ratón diariamente. Los animales deberían morir a los pocos días después de que la concentración de tripanosomas alcanza 10^8 /ml. Se ha comprobado que la concentración del 2% de DFMO tiene una acción protectora (23).

Los resultados son similares cuantitativamente a aquellos con *T. b. brucei* (Tabla 7.3) excepto que las curas del *T. b. brucei* fueron obtenidas con 1% de DFMO cada un día después de la infección, y continuada durante tres días. Las diferencias aparentes en los resultados de los dos experimentos, podrían deberse a uno o mas de los siguientes factores (23):

a) *T. b. brucei* podría diferir apreciablemente de *T. b. rhodesiense* en su susceptibilidad a la droga.

b) La cepa de *T. b. rhodesiense* podría rápidamente invadir los espacios de tejido, donde las concentraciones de la droga no son ricas en niveles curativos.

c) El sistema inmune del huésped puede responder menos a una infección por *T. b. rhodesiense*, apoyando la tercera posibilidad obtenida de que las diferentes cepas genéticas de ratón difieren en susceptibilidad. No obstante, esto claramente significa que para ambos *T. b. brucei* o *T. b. rhodesiense*, la DFMO tiene un efecto protector y permanente en las infecciones rápidas fulminantes .

7.4.2 COCCIDIOSIS

Otro grupo de protozoarios parásitos heterogeneos llamado los coccidia, son parásitos clásicos del epitelio intestinal de vertebrados (23, 82).

Un parásito de las aves tal como *Eimeria tenella*, crece intercelularmente en las células epiteliales del caeco cecum, como un trofozoito, después sufre esquizogonia, una forma de mitosis múltiple, para formar un gran número de merozoitos. Los merozoitos son después liberados para interaccionar con otras células. La pared del saco del pollo, en el caso de *E. tenella*, es muy dañado y esto se manifiesta por una pérdida severa de sangre y la muerte en muchos casos (23).

La DFMO tiene un potente efecto anticoccidial contra infecciones de *E. tenella* en pollos (23, 53) y reducen las lesiones cecales que frecuentemente conducen a una severa pérdida de sangre y la muerte. En ambos tipos de infecciones, los efectos terapéuticos

reversibles de la DFMO pueden observarse con la coadministración de poliaminas que evitan el bloqueo enzimático (23).

7.4.5 MALARIA

Los parásitos del género *Plasmodium* son los agentes de la malaria. El *Plasmodium falciparum* es una de las especies la cual causa una enfermedad aguda en el hombre y esta ampliamente distribuida en Sudamérica, África y el sureste de Asia.

En el huesped, la malaria se multiplica rápidamente en los eritrocitos donde se metaboliza la hemoglobina, y otros constituyentes de los eritrocitos. El parásito intracelular es un pequeño trofozoito que crece y se divide asexualmente por esquizogonia; el ciclo de vida es similar en principio a la *Eimeria*. Hay un insecto vector en este caso, el cual es la hembra del mosquito *Anopheles* (23).

En 1981, se reportaron los resultados de los estudios iniciales por Cain sobre los efectos de la DFMO en cepas de *Plasmodium falciparum* (113). Por cultivos de *P. falciparum* in vivo y midiendo el desarrollo de los parásitos desde el principio de un ciclo esquizogónico, se determinó que la DFMO tiene un efecto significativo sobre su habilidad para sufrir esquizogonia. Después de 24 horas, los trofozoitos recibieron 5.0 y 6.6mM de DFMO, comenzando a aparecer más pequeños que en las cepas control y que fueron sometidas a concentraciones bajas de DFMO. Esta diferencia fue más pronunciada por 36 horas, y fue acompañada por una reducción marcada en el número de esquizoitos en las células tratadas con 5.0 y 6.6mM de DFMO (23).

Los parásitos en los grupos tratados con la droga (DFMO 5.0 y 6.6mM), fueron aparentemente detenidos en la etapa de trofozoito, mostrando una reducción distinta en su habilidad para sufrir esquizogonia. Esta tendencia continúa por 48 horas, tiempo en el cual los cultivos control junto con aquellos que recibieron DFMO 1.5mM o menos, mostraron un incremento en los números relativos de etapas anulares tempranas. Esto indica que una cantidad apreciable de la invasión dentro de nuevos eritrocitos toman lugar en estas cepas (23).

La DFMO (5.0 a 6.6mM) parece bloquear la habilidad de los parásitos para dividirse mitóticamente de manera similar a los efectos que la droga tiene en células de mamíferos, donde funciona por decremento en las poliaminas intracelulares las cuales causan un cambio en la detención de la síntesis de DNA (23, 113). Para probar esta posibilidad, los efectos de la DFMO sobre la incorporación de ³H-hipoxantina, un precursor de ácido nucleico en *P. falciparum*, fueron examinados. Una concentración 10mM de DFMO inhibe fuertemente la incorporación de hipoxantina dentro del material precipitable con ácido tricloroacético, pero no antes de 9 horas, que se presume es el tiempo necesario para disminuir los niveles de putrescina y espermidina (23).

7.4.4 OTROS EFECTOS ANTIPROTOZOARIOS DE LOS INHIBIDORES DE LA ODC

La DFMO inhibe la replicación de un número de parásitos incluyendo varios tripanosomas africanos y *Eimeria tenella*, *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum* y *Pneumocystis carinii*. Es remarcadamente activa contra infecciones de *T. b. brucei* en ratón y actúa contra cepas de *T. congolense*, los cuales son resistentes a tripanocidos estandar.

El metil ester del 2-fluorometildehidro-ornitina es más efectivo que la DFMO contra la proliferación de malaria en roedores. Este inhibidor de la ODC es también más potente que la DFMO contra tripanosomas, pero es mucho menos activo que el (2R, 5R)-MAP.

La DFMO es una droga efectiva contra las infecciones de neumonia causadas por *Pneumocystis carinii*, el cual se considera un esporozoario (7).

Las concentraciones altas de DFMO requeridas, tan bien como el conocimiento de que la DFMO es ineficaz en el tratamiento de infecciones eritrocíticas de *P. gallinaceum* en pollos y *P. berghei*, disminuyeron el interés por la malaria en relación con los tripanosomas.

G. Boné propuso el estudio de los efectos de la DFMO en otras fases del ciclo de vida del *P. berghei* llamado esquizogonia exoeritrocítica y subsecuentemente en la esporogonia del insecto vector *Anopheles stephensi*.

Los resultados obtenidos mostraron que la DFMO al 1% en agua de consumo diario administrada a ratones infectados con formas eritrocíticas de *P. berghei* no tiene efecto. En contraste, una dosis de protección contra la infección exoeritrocítica con esporozoitos fue demostrada con DFMO al 0.1%, 0.5% y 1%, protegiendo 27%, 75% y 92% de animales infectados respectivamente, por lo tanto se concluye que la esquizogonia eritrocítica no es afectada por DFMO. La esquizogonia exoeritrocítica (en células de hígado) es inhibida rápidamente.

También se demostró:

1) La inhibición del ciclo de la esporogonia de *P. berghei* en el insecto vector por administración de DFMO a los mosquitos en una solución azucarada o medio sanguíneo de ratón tratado con DFMO y,

2) El desarrollo de inmunidad a exoeritrocítico pero no a la infección eritrocítica en casi dos terceras partes de ratones inoculados de 2 a 3 veces (en intervalos semanales) con esporozoitos (con jeringa o mosquito) en presencia de DFMO ó DFMO y cloroquina. Los hallazgos sugieren una aproximación a la "vacunación" contra la malaria, parecida a la que se observó primero en coccidiosis.

Se ha sugerido que estos hallazgos pueden ser aplicables al

hombre y que podrian usarse en un programa de prevencion de la infeccion causada por malaria (113).

7.4.5 EFECTOS ANTIVIRALES DE LOS INHIBIDORES DEL METABOLISMO DE POLIAMINAS

La DFMO inhibe la actividad de la ODC previniendo la proliferación celular en cepas despues de que se han reducido las poliaminas endógenas y el ciclo celular es detenido antes de la iniciación de la síntesis de DNA y el final de la fase G1. El efecto inhibitorio puede revertirse por la provision exógena de putrescina, espermidina o espermina mostrando por tanto que hay un requerimiento absoluto de poliaminas en la proliferación celular. Los parásitos intracelulares son obligados, y durante su replicación el genoma infectivo modifica el metabolismo de la célula huésped para producir un ácido nucleico viral específico y proteínas. Puesto que las poliaminas se requieren para la síntesis macromolecular durante la multiplicación de células procarionóticas y eucarióticas, es razonable proponer que estas bases alifáticas deberian también ser requeridas para la replicación de los virus. Las poliaminas han mostrado ser esenciales en la replicación de diferentes virus bacterianos pero poco se conoce de los requerimientos similares en la replicación de virus animales.

La extrapolación de sistemas procarionotes a eucariotes es poco aconsejable, en vista de una asociación aparentemente única de espermina con las células animales. La replicación de ciertos virus animales en cultivos de células, se previene por inhibidores de la biosíntesis de poliaminas, pero pocos estudios se han hecho del metabolismo de poliaminas de células animales infectadas por virus.

Esto es una omisión desafortunada, puesto que tales modelos podrian responder preguntas fundamentales de la naturaleza general concerniente a las funciones biológicas de las poliaminas. Mas específicamente, el metabolismo alterado de las poliaminas, el cual es consiguiente en la infección viral, podria ser pertinente en relación a la patogenicidad de las enfermedades por virus. El efecto antiviral de los inhibidores de las poliaminas demostrados in vivo también fomenta la posibilidad de su uso en un contexto quimoterapéutico.

Aunque se ha demostrado un efecto antiviral de la DFMO contra virus vaccinia y el citomegalovirus de humano (CMV) en células diploides humanas (MRC-5) con valores de ED₅₀ de cerca de 5mM en cada caso, la replicación del virus de herpes simple tipo 2 (HVS-2), no fue afectada por DFMO 10mM. Asimismo, las mismas concentraciones del compuesto no inhiben la replicación del HVS-2 o CMV murino en cultivos de células primarias de fibroblastos de embrión de ratón (MEF).

El crecimiento de HVS-2 en células BHK-21, muestra que son afectadas por DFMO, pero solamente despues de la exposición de los cultivos de células al inhibidor despues de la infección. Al

pretratamiento con DFMO, es una parte integral de la prueba de reducción de placa el cual no ha sido efectivo. Sin embargo, la propiedad antiviral del metilglucosil (MGBG) contra HVS-2, podría no solamente demostrarse en el régimen similar usado. Estas aparentes discrepancias, podrían resolverse con la observación que, a diferencia de los resultados obtenidos en las células humanas, DFMO 10mM no inhibe la replicación del virus vaccinia en cultivos de MEP, aunque se manifiesta algún efecto por altas concentraciones del compuesto. Esto es concebible, ya que la DFMO no alcanza una concentración intracelular en ciertos sistemas celulares huésped para ejercer un efecto inhibitorio contra la replicación del HVS-2.

Los efectos antivirales de la DFMO podrían relacionarse al incremento o expresión continua de la actividad de la ODC en células infectadas con virus vaccinia o CMV humana. En contraste, el HVS-2 no estimula la actividad de la enzima y en otras infecciones de HVS, la síntesis de poliaminas se inhibe. El fracaso de la DFMO para inhibir la replicación del HVS-2 en los sistemas celulares utilizados sugiere que no se requiere la biosíntesis de poliaminas para la replicación de este virus.

Un estudio reciente, demuestra que el MGBG tiene un efecto antiviral más potente *in vitro* que otras drogas usadas clínicamente en el tratamiento de infecciones de CMV humano (96).

CAPITULO IX. CONCLUSIONES

1. La ornitina descarboxilasa se encuentra en el citoplasma, en el núcleo y en el nucleolo.
2. La ornitina descarboxilasa se encuentra unida por fosfatidilinositol a la membrana plasmática.
3. Las propiedades fisicoquímicas de la ornitina descarboxilasa varían dependiendo de la fuente biológica.
4. La actividad de la ornitina descarboxilasa se incrementa en respuesta a hormonas, drogas, regeneración de tejidos y factores que estimulan el crecimiento celular.
5. La regulación de la actividad de la ornitina descarboxilasa se lleva a cabo por hormonas y antienzimas.
6. La ornitina descarboxilasa puede ser inhibida específicamente con análogos de sustrato o del producto.
7. La ornitina descarboxilasa ha sido inhibida en diferentes sistemas con crecimiento activo.
8. Los resultados obtenidos en el tratamiento de parasitosis experimentales y en humanos ofrece nuevas perspectivas en la investigación de antiparasitarios.

BIBLIOGRAFIA

1. Haby, Olla: Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19: 1-26, 1981.
2. Persson, Le: The specific activity of purified mammalian ornithine decarboxylase is in accordance with the theoretical value of a pure enzyme. *Acta Chem. Scand. B* 35: 737-745, 1981.
3. Kameji, Takaaki and Hayashi, Shin-Ichi: Affinity labeling of purified ornithine decarboxylase by α -difluoromethylornithine. *Biochim. Biophys. Acta* 705: 405-407, 1982.
4. Persson, Le, Rosengren, E. and Udman, R.: Immunocytochemical demonstration of ornithine decarboxylase. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, edited by U. Bachrach, A. Kaya, and R. Chayen. Raven Press, New York, 1983, 571-583.
5. Mustelin, T., Pääs, H., Lapinjoki, S. P., Gynther, J. and Andersson, L. C.: Growth signal transduction: rapid activation of covalently bound ornithine decarboxylase during phosphatidylinositol breakdown. *Cell* 49: 171-176, 1987.
6. Persson, L., Rosengren, E. and Sundler, F.: Localization of ornithine decarboxylase by immunocytochemistry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104(4): 1196-1201, 1982.
7. Parr, A. E.: Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234: 247-262, 1986.
8. Kameji, T., Fujita, K., Neguchi, T., Takiguchi, M., Meri, M., Tatibana, M. and Hayashi, S.: Cell-free synthesis of ornithine decarboxylase. *Eur. J. Biochem.* 144: 35-39, 1984.
9. Méndez, J. D. y Hicks, J. J.: Presencia y función de las poliaminas en el aparato reproductor masculino. *Ginecología y Obstetricia de México* 55(302): 128-132, 1987.
10. Méndez, J. D. y Hicks, J. J.: Metabolismo de las poliaminas en diferentes condiciones fisiológicas de la mujer. *Ginecología y Obstetricia de México* 52(325): 133-138, 1984.
11. Matsufuji, S., Fujita, K., Kameji, T., Kanamoto, R., Murakami, Y. and Hayashi, S.: A monoclonal antibody to rat liver ornithine decarboxylase. *J. Biochem.* 96: 1525-1530, 1984.
12. Persson, L.: Antibodies to ornithine decarboxylase. Immunochemical Cross-reactivity. *Acta Chem. Scand. B* 36: 685-688, 1982.
13. Haddox, M. K. and Russell, D. H.: Ornithine decarboxylase from calf liver. Purification and properties. *Biochemistry* 20(23): 6721-6728, 1981.
14. Persson, L.: Decarboxylation of ornithine and lysine by ornithine decarboxylase from kidneys of testosterone treated mice. *Acta Chem. Scand. B* 35: 451-459, 1981.

15. Kameji, T., Murakami, Y., Fujita, Y. and Hayashi, S.: Purification and some properties of ornithine decarboxylase from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 717: 111-117, 1982.
16. Méndez, J. D. y Hicke, J. J.: Las poliaminas y el sistema reproductor de la hembra. *Ginecología y Obstetricia de México* 50(302): 157-164, 1982.
17. Lew, M. G.: Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem. J.* 244: 1-13, 1987.
18. Verel, S. and Heppel, J.: Polyamines stimulate the phosphorylation of phosphatidylinositol in membranes from A 431 cells. *Eur. J. Biochem.* 154: 253-257, 1986.
19. Hietala, O. A.: Detection of ornithine decarboxylase antisense in mouse brain. *J. Neurochem.* 40: 1174-1177, 1983.
20. Canellakis, E. S., Kellar, J. S. and Kyriakidis, D. A.: The interaction of ornithine decarboxylase with its antisense. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 1-13.
21. Mitchell, J. L. A.: Post-translational controls of ornithine decarboxylase activity. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 15-26.
22. Grille, M. A., Bedino, S. and Testore, G.: Studies on ornithine decarboxylation in chicken liver. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 27-37.
23. McCann, P. P., Sacchi, C. J., Hanson, W. L., Cain, G. D., Nathan, H. C., Hutner, S. H. and Sjoerdsma, A.: Effect on parasitic protozoa of ω -difluoromethylornithine - an inhibitor of ornithine decarboxylase. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 97-110.
24. Gilad, G. M. and Gilad, V. H.: Labelled suicidal inhibitor as a cytochemical marker for ornithine decarboxylase. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 111-121.
25. Abdal-Yonem, M. H.: Inhibitors of polyamine biosynthesis. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 137-151.
26. Haddex, M. K. and Haddock, D. R.: Ornithine decarboxylase expression in normal and neoplastic growth. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 275-286.
27. Herbst, E. J. and Branca, A. A.: Polyamines, ornithine decarboxylase antisense, and HeLa cell proliferation. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 287-297.

20. Porta, R. and Della, J. P.: Polyamine metabolism and female reproductive cycle in mammals. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 321-324.
29. Coffine, P.: Cyclic AMP, polyamines and growth regulation in cultured mouse lymphoma cells. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 327-331.
30. Cl6, C., Tantini, B., Ceccolini, M. W. and Calderara, C. M.: Involvement of polyamines in cyclic AMP metabolism in heart cell cultures. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 333-345.
31. Heby, O., An-hus, S., Linden, M. and Oredsson, S.: Tumor cell proliferation as affected by changes in intracellular and extracellular polyamine levels. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 357-364.
32. Marton, L. J.: Polyamines and brain tumors: relationship to patient monitoring and therapy. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 425-430.
33. Scalabrino, G., Ferioli, M. E., Medema, D. and Puerari, W.: Levels of activity of polyamine biosynthetic decarboxylases as indicators of the degree of malignancy of human neoplastic tissues. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldera, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Raven Press, New York, 1981, 451-462.
34. Morris, D. R.: Section introduction: biosynthesis of polyamines. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 1, Campbell, R. A. et al, Eds., Raven Press, New York, 1978, 13-15.
35. Canellakis, E. S., Heller, J. S., Kyriakidis, D. and Chaz, K. Y.: Intracellular levels of ornithine decarboxylase, its half life, and a hypothesis relating polyamine-sensitive membrane receptors to growth. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 1, Campbell, R. A. et al, Eds., Raven Press, New York, 1978, 17-29.
36. Fuller, J., Greenspan, S. and Clark, J. L.: Regulation of ornithine decarboxylase activity in 3T3 cells stimulated to growth. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 1, Campbell, R. A. et al, Eds., Raven Press, New York, 1978, 31-34.
37. Mitchell, J. L. A., Anderson, S. N., Carter, D. D., Sedery, M. J., Scott, J. P. and Varland, D. A.: Role of modified forms of ornithine decarboxylase in the control of polyamine synthesis. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 1, Campbell, R. A. et al, Eds., Raven Press, New York, 1978, 35-49.
38. Levine, J. H., Leaming, A. B. and Raskin, P.: On the mechanism of activation of hepatic ornithine decarboxylase by cyclic AMP. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 1, Campbell, R. A. et al, Eds., Raven Press, New York, 1978, 51-58.

39. Sterlich, C. and Scheffler, I. E.: Selection of ornithine decarboxylase deficient mutants of Chinese hamster ovary cells. In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 100-111.
40. Merris, D. R. and Becker, F. A.: Biosynthetic and biodestructive ornithine and arginine decarboxylases from *Escherichia coli*. In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 125-134.
41. Tyagi, A. K., Tabor, C. W. and Tabor, H.: Ornithine decarboxylase (*Saccharomyces cerevisiae*). In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 135-139.
42. Mitchell, J. L. A.: Ornithine decarboxylase and the ornithine decarboxylase-modifying protein of *Physarum polycephalum*. In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 140-146.
43. Kuehn, G. D., Atmar, V. J. and Daniels, G. R.: Polyamine-dependent protein kinase from the slime mold *Physarum polycephalum*. In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 147-154.
44. Hayashi, S. and Kameji, T.: Ornithine decarboxylase (rat liver). In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 154-158.
45. Seely, J. E. and Pegg, A. E.: Ornithine decarboxylase (mouse kidney). In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 159-161.
46. Kyriakidis, D. A., Panagietidis, C. A. and Georgatzes, J. G.: Ornithine decarboxylase (germinated barley seeds). In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 162-166.
47. Persson, L., Rosengren, E., Sundler, F. and Uddman, R.: Immunocytochemical localisation of ornithine decarboxylase. In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 166-169.
48. Zagen, I. S., Seely, J. E. and Pegg, A. E.: Autoradiographic localisation of ornithine decarboxylase (rat liver). In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 169-176.
49. Hayashi, S. and Fujita, K.: Antizyme and antizyme inhibitor of ornithine decarboxylase (rat liver). In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 185-193.
50. Kyriakidis, D. A., Keller, J. S. and Canellakis, E. S.: Purification of ornithine decarboxylase antizymes (*Escherichia coli*). In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 193-199.

51. Rey, P., Casara, P., Vavert, J. and Metcalf, B.: Synthesis of irreversible inhibitors of polyamine biosynthesis. In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 199-206.
52. Seely, J. E., Pflus, H. and Page, A. E.: Labeling and quantitation of ornithine decarboxylase protein by reaction with α -(5-¹⁴C)difluoromethylornithine. In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 206-209.
53. McCann, P. P., Bacchi, C. J., Hansen, W. L., Nathan, H. C., Hutner, S. H. and Sjoerdsma, A.: Methods for the study of the treatment of protozoan diseases by inhibitors of ornithine decarboxylase. In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 209-213.
54. Fozard, J. R. and Part, M.: Methods for the study of the experimental interruption of pregnancy by ornithine decarboxylase inhibitors: effects of DL- α -difluoromethylornithine. In: Methods in enzymology, Vol. 94, Tabor, H. and White Tabor, C., Academic Press, New York, 1983, 213-216.
55. Hopkins, D. and Manchester, K. L.: Polyamines: molecules in search of a role? South African Journal of Science 78: 25-29, 1982.
56. Kallio, A. and McCann, P. P.: Difluoromethylornithine irreversibly inactivates ornithine decarboxylase of *Pseudomonas aeruginosa*, but does not inhibit the enzymes of *Escherichia coli*. Biochem. J. 200: 69-75, 1981.
57. Bitenti, A. J., McCann, P. P. and Sjoerdsma, A.: Restriction of bacterial growth by inhibition of polyamine biosynthesis by using monofluoromethylornithine, difluoromethylornithine and dicyclohexylammonium sulphate. Biochem. J. 209: 435-441, 1982.
58. Friedman, S. J., Ballantyne, R. A. and Canellakis, E. S.: Ornithine decarboxylase activity in synchronously Don C Cells. Biochem. Biophys. Acta 261: 188-193, 1972.
59. Mennucco, L., Rojas, S., Plesman, C. E.: Polyamines and ornithine decarboxylase activity during growth and differentiation in *Blasodadiella amerseui*. Biochem. Biophys. Acta 404: 249-256, 1975.
60. Alhonen-Hangisto, L.: Inhibition of polyamine accumulation and cell proliferation by derivatives of diaminepropane in Ehrlich cells grown in culture. Biochem. Biophys. Acta 564(3): 473-487, 1979.
61. McCann, P. P., Tarliff, C., Fament, P. S. and Shuber, P.: Regulation of ornithine decarboxylase by ornithine decarboxylase antizyme in HTC cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75: 948-954, 1975.
62. Boyle, S. H. and Adachi, K.: Biosynthetic ornithine and arginine decarboxylases: correlation of rates of synthesis with activities in *Escherichia coli* during exponential growth and following nutritional shift-up. Can. J. Microbiol. 28(9): 945-950, 1982.

63. Underlied, T. B., Sihlar, R. L. and Syphard, P. E.: Regulation of ornithine decarboxylase during morphogenesis of *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.* 141: 699-707, 1970.
64. Cheatham, B. F. and Ballatt, A. J.: A biochemical investigation of the adenovirus induced G1 to S phase progression: thymidine kinase, ornithine decarboxylase, and inhibitors of polyamine biosynthesis. *J. Cell. Physiol.* 110: 114-122, 1982.
65. Sakai, T. T. and Cohen, S. S.: Regulation of ornithine decarboxylase activity by guanine nucleotides: In vivo test in potassium-depleted *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73(10): 3502-3505, 1976.
66. Kyriakidis, D. A., Heller, J. S. and Canellakis, T. S.: Modulation of ornithine decarboxylase activity in *Escherichia coli* by positive and negative effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75(10): 4679-4703, 1978.
67. Mändes, J. D.: Polyamines and human reproduction. In: *The physiology of polyamines*, Bachrach, U. and Heimer, Y., Eds., C.R.C. Press Inc., Florida, USA, 1978.
68. Lundgren, D. W. and Oka, T.: Alterations in polyamine levels in rat blood during pregnancy and lactation. *Am. J. Physiol.* 234: E451-E456, 1978.
69. Russell, D. H. and Haddox, M. K.: Antiproliferative effects of retinoids related to the cell cycle-specific inhibition of ornithine decarboxylase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 359: 281-297, 1981.
70. Hülitta, E., Jänne, J. and Pispä, J.: The regulation of polyamine synthesis during the stringent control in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 59: 1104-1111, 1974.
71. Heby, O., Gray, J. W., Lindle, P. A., Marten, J. L. and Wilson, C. E.: Changes in L-ornithine decarboxylase activity during the cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 71(1): 99-105, 1976.
72. Haddox, M. K. and Russell, D. H.: Cell cycle-specific locus of vitamin A inhibition of growth. *Cancer Res.* 39: 2476-2480, 1979.
73. Haddox, M. K., Scott, K. F. F. and Russell, D. H.: Retinal inhibition of ornithine decarboxylase induction and G1 progression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 39: 493C-493R, 1979.
74. Jänne, J., Alhonen-Henigste, L., Seppänen, P. and Hülitta, E.: Cellular compensatory mechanism during chemically induced polyamine deprivation. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Calderara, C. M., Zappia, V. and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 85-94.
75. Taber, H. and White-Taber, C.: Biosynthesis and metabolism of 1,4-diaminobutane, spermidine, spermine and related amines. *Adv. Enzymol.* 36: 203-268, 1972.
76. Mivechi, N. F., Dewey, W. C., Feuerstein, B. G., Dean, D. P. and Marten, L. J.: Relationship between heat sensitivity and polyamine levels after treatment with α -difluoromethylornithine (DFMO). *Radiation Research* 108(3): 269-281, 1986.

77. Bortich, T. J. and Perry, A. E.: Polyamine administration reduces ornithine decarboxylase activity without affecting its mRNA content. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 143(2): 424-430, 1987.
78. Tamai, T. and Kiang, D. T.: Additive growth-inhibitory effects of DL- α -Difluoromethylornithine and antiestrogens on MCF-7 breast cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 148(3): 1332-1345, 1987.
79. Marten, L. J. and Feuerstein, S. G.: Polyamine-DNA interactions: possible site of new cancer chemotherapeutic intervention. *Pharm. Res.* 3(6): 311-317, 1986.
80. Applbaum, D. M. and Morris, D. R.: Comparison of biosynthetic and biosynthetic ornithine decarboxylase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 16: 1580-1584, 1977.
81. Wright, J. M. and Boyle, S. M.: Negative control of ornithine decarboxylase and arginine decarboxylase by adenosine-3':5' cyclic monophosphate in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 196: 482-487, 1982.
82. Fozard, J. R. and Koch-Weser, J.: Pharmacological consequences of inhibition of polyamine biosynthesis with DL- α -Difluoromethylornithine. *Trends in Pharmacological Sciences* 3(3): 107-110, 1982.
83. Voorhees, J. J.: Polyamines and psoriasis. *Arch. Dermatol.* 115: 943-944, 1979.
84. Grosshans, E. and Henry, M.: Skin polyamine levels in psoriasis: the effect of therapy. *J. Invest. Dermatol.* 70: 227, 1978.
85. Hälttö, E., Korpela, K. and Hew, T.: Several inhibitors of ornithine and adenosylmethionine decarboxylases may also have antiproliferative unrelated to polyamine depletion. *Biochim. Biophys. Acta* 677: 90-102, 1981.
86. Hogan, B. L. M. and Murden, S.: Effect of growth conditions on the activity of ornithine decarboxylase in cultured hepatoma cells. Effect of amine acid supply. *J. Cell. Physiol.* 83: 345-351, 1974.
87. Hogan, B. L. M. and Murden, S.: Effect of growth conditions on the activity of ornithine decarboxylase in cultured hepatoma cells. Effect of serum and insulin. *J. Cell. Physiol.* 83: 353-358, 1974.
88. Lehninger, A. L. *Bioquímica. Ediciones Omega, Barcelona*, 161-187, 250-251, 728, 1986.
89. Bustamante Olea, F. J. *Sistema tegumentario. UNAM. ENEP Intacola*, 169-170, 1984.
90. Saúl, Amade. *Lecciones de dermatología. Francisco Méndez Cervantes (ed.)*, México, 1973, 271-274.
91. Méndez, J. D.: *Poliaminas. En Bioquímica e inmunología. Hicks, J. J. y Díaz, J. C. (eds.) Facultad de Medicina, UNAM, México*, 1988, 365-385.

92. Hicks, J. J. y Méndez, J. D.: Enzimas. En *Bioquímica e inmunología*. Hicks, J. J. y Díaz, J. C. (eds.) Facultad de Medicina, UNAM, México, 1988.
93. Scalabrino, G., Perioli, M. F. and Medina, J.: Decreased activity of ODC antizyme during hyperplastic and neoplastic growth of rat liver. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 79-96.
94. Beutwell, R. K.: Evidence that an elevated level of ODC activity is an essential component of tumor promotion. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 127-134.
95. Pflü, H. and Paulin, L.: ODC activity from an extremely thermophilic bacteria, *Clostridium Therhydro-sulfuricum*. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 490-494.
96. Tyms, A. S., Raval, B. K., Narm, H. M. and Williamson, J. D.: The antiviral effect of inhibitors of polyamine metabolism. In: *Advances in Polyamine Research*, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 507-517.
97. Calderera, C. M., Flamigni, F., Muscari, C., Clé, C. and Guarnieri, C.: Evidence for sulfhydrylic involvement in the activation of rat heart ornithine decarboxylase by oxygen radicals and hyperoxia. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 525-536.
98. Guarnieri, C., Flamigni, F., Muscari, C. and Calderera, C. M.: Ornithine decarboxylase activity evaluated in perfused rat heart in response to catecholamine. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 537-548.
99. Gilad, G. M. and Gilad, V. H.: Visualization of rhodamine-labeled α -DFMO in viable neuroblast: towards in vivo localization of ornithine decarboxylase. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 585-590.
100. Pflü, H., Seely, J. F., Zagon, I. S. and Park, A. F.: The use of α -DFMO to study eucaryotic ornithine decarboxylase. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 601-613.
101. Fujita, K., Murakami, Y., Kameji, T., Watsufuji, S., Utsunemiya, K., Kancimoto, R. and Hayashi, S.: Regulation of hepatic ornithine decarboxylase by antizyme and antizyme inhibitor. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 683-691.
102. Gilad, G. M.: Requirement for polyamines in the response of sympathetic neurons to axonal injury. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 705-706.

107. Anshus, S., Linden, M., Ferr, A., Lönnerström, E. and Heby, O.: Cell cycle dependent induction of ornithine decarboxylase and its antisense in Ehrlich ascites tumor cells separated by centrifugal elutriation. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 707-712.
108. Sjösten, D., Yarib, M., Kaye, A. M., Kerenstein, R., Fischler, H. and Binderman, I.: Ornithine decarboxylase activity in cultured bone cells is activated by Bone-Seeking hormones and physical stimulation. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 713-718.
109. Henningsen, A. Ch., Henningsen, S., Tjälve, H., Hammar, L. and Löwendhal, G.: Whole body and microautoradiographic localization of ODC in the kidneys of nandrolone-treated mice using tritium labelled α -DFMO. In: *Advances in Polyamine Research*, Vol. 4, Bachrach, U., Kaye, A. and Chayen, R., Raven Press, New York, 1983, 719-726.
110. Heby, O. and Andersson, G.: Polyamines and the cell cycle. In: *Polyamines in Biomedical Research*, Gaugas, J. M., John Wiley & Sons, 1980, 17-34.
111. Beynon, A. L., Whitfield, J. F. and Walker, P. R.: The possible roles of polyamines in prereplicative development and DNA synthesis. A critical assessment of evidence. In: *Polyamines in Biomedical Research*, Gaugas, J. M., John Wiley & Sons, 1980, 63-80.
112. Bachrach, U.: The induction of ODC in normal and neoplastic cells. In: *Polyamines in Biomedical Research*, Gaugas, J. M., John Wiley & Sons, 1980, 81-108.
113. McCann, P. P.: Regulation of ODC in eukaryotes. In: *Polyamines in Biomedical Research*, Gaugas, J. M., John Wiley & Sons, 1980, 100-124.
114. Mament, P. S., Bey, P. and Koch-Weser, J.: Biochemical consequences of drug induced polyamine deficiency in mammalian cells. In: *Polyamines in Biomedical Research*, Gaugas, J. M., John Wiley & Sons, 1980, 147-166.
115. Stevens, L. and Stevens, F.: Inhibitors of the biosynthesis of putrescine, spermidine and spermine. In: *Polyamines in Biomedical Research*, Gaugas, J. M., John Wiley & Sons, 1980, 167-184.
116. Taber, C. W., Taber, H. and Tyagi, A. K.: Biochemical and genetic studies of polyamines in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Polyamines in Biomedical Research*, Gaugas, J. M., John Wiley & Sons, 1980, 457-479.
117. Sjoerdsma, A. and Schechter, P. J.: Chemotherapeutic implications of polyamine biosynthesis inhibition. *Clin. Pharmacol. Ther.* 15(3): 297-300, 1974.
118. Kaye, A. M.: Purification and properties of ornithine decarboxylase. Deeds, R. A. and Chayen, J.: Histochemical and cytochemical demonstration of ornithine decarboxylase. Bachrach, U.: Physiological aspects of ornithine decarboxylase. *Cell Biochemistry and Function* 2(1): 2-11, 1984.

115. Mitchell, L. A., Rynning, M. D., Chen, K. J. and Hicks, W. F.: Interrelation between the charge isoforms of mammalian ornithine decarboxylase. Archives of Biochemistry and Biophysics 260(2): 585-594, 1989.
116. Pritchard, V. L., Saely, J. E., Pösch, H., Jefferson, L. S. and Pegg, A. E.: Binding of radioactive α -difluoromethylornithine to rat liver ornithine decarboxylase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 100(4): 1597-1603, 1981.
117. Freuty, W. F. and Oberlander, M. F.: Detection of multiple forms of rat liver ornithine decarboxylase. Fe. Proc. 35: 1657, 1976.
118. Chen, K., Heller, J. S. and Canellakis, E. S.: The inhibition of the induction of ornithine decarboxylase by cations. Biochem. Biophys. Res. Comm. 70(1): 212-220, 1976.