

4  
283

11281

*UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO*

**"ACCION DE L-ARGININA Y POLIAMINAS SOBRE EL  
FUNCIONAMIENTO DEL PANCREAS EN LA RATA DIABETICA"**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(BIOQUIMICA)**

PRESENTA

M. en C. JOSE DOMINGO MENDEZ FRANCISCO

MEXICO, D.F.

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.	
SUMMARY.	
INTRODUCCION .....	1
GENERALIDADES .....	2
Páncreas .....	2
Acini .....	2
Islotes de Langerhans .....	4
DIABETES MELLITUS .....	5
Clasificación de la diabetes mellitus y otras categorías de intolerancia a la glucosa .....	6
Clases clínicas .....	7
Tipo I: Diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) .....	7
Tipo II: Diabetes mellitus no-insulino dependiente (NIDDM) .....	9
Diabetes mellitus asociada a desnutrición (MRDM) ....	11
Otros Tipos de Diabetes .....	12
Desajustes en la tolerancia a la glucosa (IGT) .....	13
Diabetes gestacional .....	14
Clases de riesgo estadístico .....	15
Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa (PreAGT) .....	16
Anormalidad potencial de tolerancia a la glucosa (PotAGT) .....	16
TRATAMIENTO .....	16
HIPERGLUCEMIA EXPERIMENTAL.....	17
Inducción química.....	18
Aloxana.....	18
Estreptozotocina .....	19
L-ARGININA .....	19
Metabolismo de arginina .....	19
Arginina y su acción en el páncreas .....	21
POLIAMINAS .....	24
Poliaminas y metabolismo de carbohidratos .....	25
INSULINA .....	26
Función .....	26
Insulina y metabolismo de carbohidratos .....	26
Insulina y metabolismo de lípidos .....	27
Insulina, metabolismo de proteínas y crecimiento .....	28
Biosíntesis .....	29
OBJETIVOS .....	33
TRABAJO EXPERIMENTAL .....	33
Primera parte .....	33
Resultados .....	34
Discusión .....	35

<i>Segunda parte</i> .....	36
<i>Resultados</i> .....	36
<i>Discusión</i> .....	36
<i>CONCLUSIONES</i> .....	38
<i>PERSPECTIVAS</i> .....	38
<i>REFERENCIAS</i> .....	39

*ANEXO 1. Poliaminas.*

*ANEXO 2. Poliaminas y reproducción humana.*

*ANEXO 3. Efecto de L-arginina sobre la arginasa  
y poliaminas pancreáticas en ratas  
diabéticas.*

*ANEXO 4. Métodos de Laboratorio.*

## RESUMEN

Se estudió la acción de L-arginina y las poliaminas putrescina, espermidina y espermina sobre la función pancreática de ratas diabéticas. Se llevaron a cabo dos series de experimentos. En la primera parte, se estudió el efecto de L-arginina sobre la actividad de arginasa y niveles pancreáticos de poliaminas en el páncreas de ratas normales y diabéticas (120 mg de aloxana/kg i.v.). Se formaron 4 grupos (10 machos adultos por grupo). I-Control-NaCl 0.154 M. II-Diabéticas-NaCl 0.154 M (96 horas después de la aloxana). III-Control + L-arginina 10 mM. IV-Diabéticas + L-arginina 10 mM. Las ratas se sacrificaron 20 minutos después de la inyección de L-arginina. En el suero se midió glucosa y en el tejido pancreático el peso seco, proteínas, actividad de arginasa y poliaminas (HPLC). Se observó una alta relación entre mg proteína/mg de peso seco e inducción de arginasa en los grupos III y IV. La putrescina disminuyó como consecuencia de la diabetes, pero se recuperó con la administración de L-arginina. Las concentraciones de espermidina y espermina disminuyeron y permanecieron bajas.

En la parte dos, se agruparon 70 ratas como sigue: I-Control-NaCl 0.154 M. II-Diabéticas-NaCl 0.154 M después de la administración de aloxana. III-Diabéticas de 96 horas + 1.5 U de insulina/kg cada 24 horas y dos horas antes del sacrificio. IV-Diabéticas + L-arginina 10 mM 2 horas antes del sacrificio. Los grupos del V al VII estuvieron formados por ratas diabéticas de 96 horas a las que se les administró 5 mg/kg, i.p. de putrescina, espermidina o espermina, respectivamente, dos horas antes del sacrificio. Se midieron en el suero las concentraciones de glucosa, triacilglicéridos, proteínas y las actividades de alfa amilasa y arginasa. En el tejido pancreático se midió actividad de arginasa y las concentraciones de proteínas y de DNA. Los cambios más importantes se observaron en las actividades de arginasa y alfa amilasa las cuales fueron notablemente incrementadas por las tres poliaminas ( $P < 0.005$ ) en el tejido pancreático, que fueron similares a los efectos de insulina y L-arginina. La putrescina disminuyó los niveles de glucosa en el suero de ratas diabéticas.

Estos resultados sugieren que la arginina es metabolizada a putrescina en el páncreas y que las poliaminas pueden ser utilizadas en los procesos de regeneración o en la recuperación de la función endócrina del páncreas.

## SUMMARY

Actions of L-arginine and polyamines putrescine, spermidine and spermine were studied on the pancreatic function of diabetic rats. Two series of experiments were carried out. In the first part, the effect of L-arginine on the arginase activity and polyamine levels was studied in the pancreas of normal and diabetic rats (120 mg/kg alloxan, i.v.). Four groups were formed (10 male adults per group). I-Control-0.154 M NaCl. II-Diabetic-0.154 M NaCl (96 h after alloxan). III-Control plus 10 mM L-arginine. IV-Diabetics plus 10 mM L-arginine. Rats were sacrificed 20 min after L-arginine injection. Glucose in serum and dry weight, proteins, arginase activity and polyamines (HPLC) in pancreas were measured. Higher ratio mg protein/mg dry weight and arginase induction was observed for groups III and IV. Putrescine was low as a consequence of diabetes but restored with L-arginine. The concentrations of spermidine and spermine were lower.

In the part two, 70 rats were grouped as follows: I-Control-0.154 M NaCl. II-Diabetic-0.154 M NaCl 96 h after alloxan. III-Diabetics 96 h plus 1.5 U insulin/kg every 24 h and two hours before the sacrifice. IV-Diabetics plus 10 mM L-arginine two hours before the sacrifice. The groups V to VII were formed of diabetic rats, 96 h after alloxan were administered 5 mg/kg i.p. of putrescine or spermidine or spermine, two hours before the sacrifice. Glucose, Triacylglycerides, alpha amylase, proteins and arginase activity in serum and total proteins, arginase activity and DNA in pancreas were measured. The most important changes were seen in the arginase and alpha amylase activities which were notably increased by the three polyamines ( $P < 0.005$ ) in pancreatic tissue and they were similar to those of insulin and L-arginine. Putrescine decreased the glucose levels in serum of diabetic rats.

These results may suggest that arginine is metabolized to putrescine in the pancreas and that polyamines may be utilized in regenerating processes or for recovering the endocrine pancreatic function.

## INTRODUCCION

La diabetes mellitus es una enfermedad sistémica que se caracteriza por una incapacidad para controlar la glucosa sanguínea, es causada por la deficiencia absoluta o relativa de insulina y se asocia frecuentemente con lesiones específicas de la microcirculación, alteraciones neuropáticas y predisposición a la aterosclerosis. Alguna vez uno de los estudiosos de la diabetes escribió que "es difícil concebir que los carbohidratos que son importantes nutrientes puedan ser la causa de cambios funcionales crónicos y permanentes, y del daño estructural en muchos tejidos del hombre y de los animales", pero hay evidencias de que elevados niveles de glucosa sanguínea pueden ser los responsables de las complicaciones severas de la diabetes.

La diabetes está relacionada con el envejecimiento, de tal manera que conforme las células se envejecen, se vuelven ineficientes y los tejidos se endurecen. Se ha descubierto que las células y los tejidos se llegan a envejecer debido en parte a los factores nutricionales.

Hoy en día, existen más preguntas acerca de las bases bioquímicas de la diabetes, que las que han sido contestadas. En particular, la patogénesis de las complicaciones crónicas, es una área de conocimiento incierto.

Nosotros hemos comenzado a incursionar en el estudio de esta enfermedad, y particularmente estamos estudiando algunos aspectos metabólicos de las poliaminas y de su precursor, la L-arginina. Tanto la arginina como las poliaminas han sido asociadas con la síntesis y liberación de insulina y como consecuencia con el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos de los efectos de la arginina y las poliaminas en el páncreas de la rata con diabetes inducida por la administración de aloxana.

Previamente se hace una descripción de los diferentes tópicos que se relacionan con el tema.

## GENERALIDADES

### PANCREAS

El páncreas es una glándula compuesta, que se encuentra situada paralelamente al estómago y detrás de él (figura 1), presenta una función secretoria endócrina y exócrina de hormonas necesarias para el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Su estructura comprende dos tipos principales de tejidos: Los acini, cuya función es la secreción exócrina y los islotes de Langerhans, responsables de la secreción endócrina; ambos regulan la homeostasis en humanos por acciones de sus productos de secreción (1).

### ACINI

Los acini son grupos de células que secretan enzimas digestivas (figura 1) en el jugo pancreático hacia las porciones altas del intestino delgado en respuesta a la presencia del quimo.

El jugo pancreático contiene enzimas que hidrolizan proteínas, carbohidratos y grasas, además de iones bicarbonato importantes para la neutralización del quimo ácido proveniente del estómago hacia el duodeno. Las principales enzimas presentes en el jugo pancreático son:

a) Enzimas proteolíticas:

- Tripsina
- Quimotripsina
- Carboxipolipeptidasa
- Ribonucleasa
- Desoxirribonucleasa
- Inhibidor de tripsina

b) Enzimas digestivas de carbohidratos:

- Amilasa pancreática

c) Enzimas lipolíticas:

- Lipasa pancreática
- Esterasa del colesterol
- Fosfolipasa

Todas las enzimas proteolíticas del jugo pancreático son activadas en el intestino por medio de la enterocinasa secretada por la mucosa intestinal cuando el quimo entra en contacto con la mucosa y son desactivadas por la enzima inhibidor de tripsina.

Cuando el páncreas es estimulado para secretar volúmenes grandes de jugo pancreático, la concentración de iones bicarbonato puede elevarse hasta valores de 145 meq/L, que son cinco veces la concentración de estos iones en plasma, eso sirve para neutralizar el ácido del quimo que llega al duodeno procedente del estómago, dando un pH adecuado para que actúen las enzimas provenientes del jugo pancreático.

Toda esta secreción pancreática está regulada por mecanismos nerviosos y hormonales, siendo la más importante la regulación hormonal.

La regulación nerviosa está ligada a la fase cefálica y gástrica de la secreción del estómago, ya que cuando se transmiten simultáneamente impulsos parasimpáticos a lo largo de los vasos hacia el páncreas, se libera acetilcolina, que causa la

secreción de cantidades moderadas de enzimas provenientes de los acinis pancreáticos.

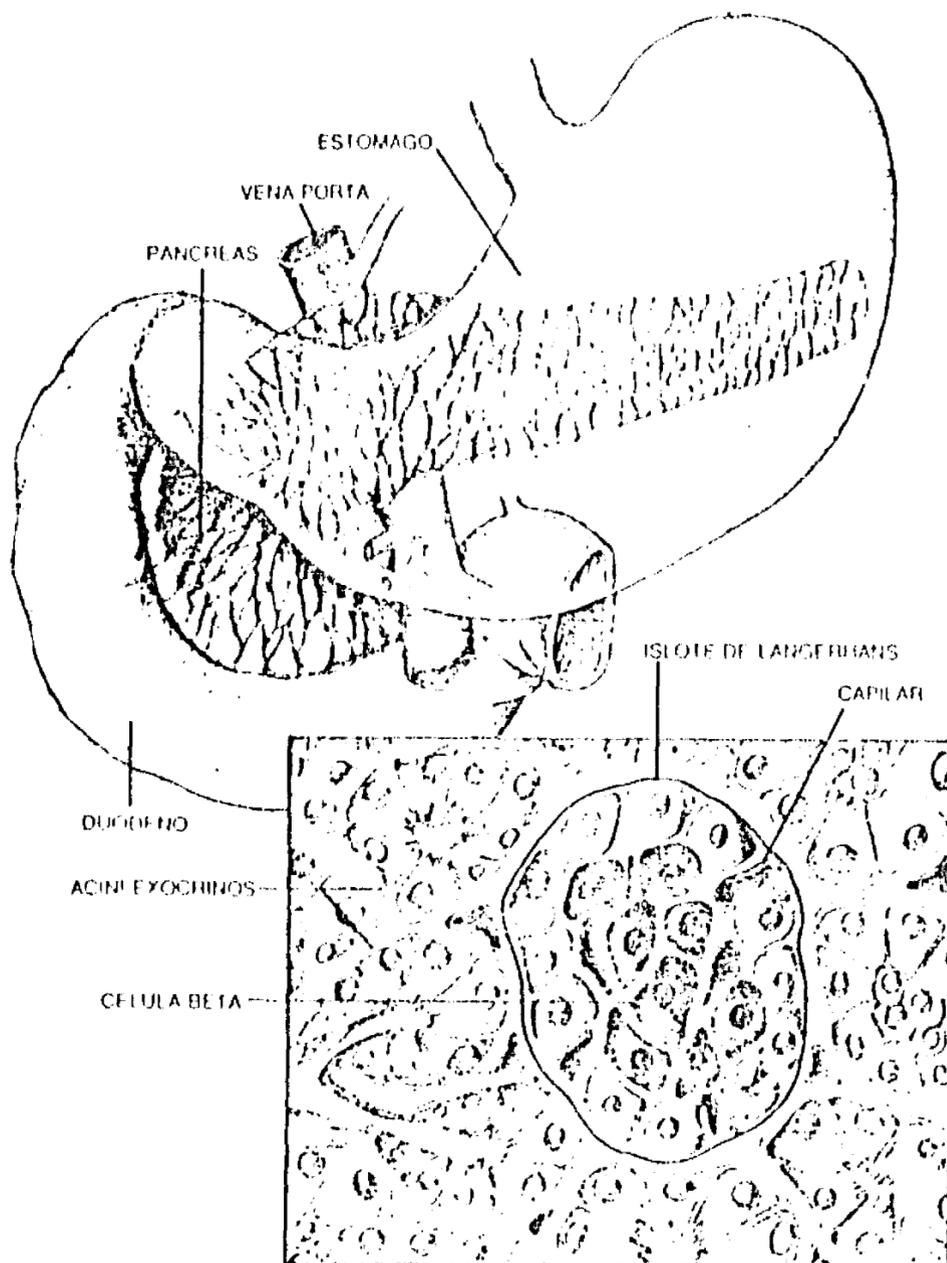


Figura 1. El páncreas se aloja debajo del estómago y su función principal es la producción de enzimas digestivas que secreta al intestino por un proceso de secreción exócrina. Dispersos por la glándula se encuentran los islotes de Langerhans (recuadro), que contienen a las células beta, productoras de insulina, la cual se libera directamente a los capilares sanguíneos por un proceso de secreción endócrina.

La acción hormonal es la que regula principalmente todo el proceso de la secreción, siendo las hormonas claves: la secretina y la colecistocinina, la primera estimula principalmente la secreción pancreática de concentraciones altas de ion bicarbonato (145 meq/L aproximadamente) y la segunda estimula la secreción de enzimas pancreáticas exócrinas; un efecto similar es provocado por la gastrina, hormona secretada en la fase gástrica de la digestión.

### ISLOTES DE LANGERHANS

Entre otras hormonas este tejido secreta hacia la sangre insulina y glucagon, principalmente. El páncreas del ser humano tiene casi un millón de islotes de Langerhans, cada uno con 100  $\mu$ g de diámetro, estando organizados alrededor de capilares (figura 1) donde sus células secretan las hormonas que producen, dichas hormonas están contenidas en gránulos secretorios (2).

Las células de los islotes de Langerhans en general se caracterizan por presentar un alto grado de compartimentalización, dado por un gran contenido de retículo endoplásmico rugoso (RER), aparato de Golgi y polisomas: también sus mitocondrias son extremadamente pequeñas en comparación con las mitocondrias de otras células, además de contener numerosos cuerpos ceroides autofluorescentes que contienen enzimas lipídicas y lisosomales.

También presentan un sistema de microtubulo-microfilamento, el cual puede ser observado adyacente a la membrana plasmática. En cultivos de células se pueden observar largas uniones de microtubulos que separan columnas lineares de gránulos beta. Los microfilamentos están presentes junto a la membrana y probablemente ocurran como fibras individuales en el interior de la célula.

Los islotes contienen varios tipos de células (2), las cuales son:

- a) Células Alfa
- b) Células Beta
- c) Células Delta
- d) Células PP
- e) Células C, E y F

Los tres tipos de células principales son las células alfa, beta y delta, que se distinguen entre sí por su morfología y sus características de coloración. A continuación se describe a grandes rasgos estos tipos de células presentes en los islotes:

**Células Alfa:** Este tipo de células secretan la hormona llamada glucagon, cuya función es la de aumentar la concentración sanguínea de glucosa, ya que esta hormona provoca la hidrólisis del glucógeno hepático y muscular e incrementa la gluconeogénesis, lo que aumenta la disponibilidad de glucosa para los otros órganos del cuerpo.

En el hombre, las células alfa están rodeadas de un saco membranoso y su distribución entre los islotes varía en diferentes especies, por ejemplo en la rata y ratón las células alfa forman un aro en la periferia del islote, en el hámster y el hombre están distribuidas en el islote y en el caballo se encuentran en el centro del islote. Las células alfa comprenden aproximadamente el 20-25% de la población de células en el islote de mamíferos adultos.

**Células Beta:** Las células beta son las encargadas de sintetizar y almacenar insulina, la cual promueve la absorción en el hígado de la glucosa ingerida almacenándose en forma de glucógeno. Lo anterior se debe a que esta hormona promueve varios mecanismos a nivel enzimático que provocan este efecto, lo cual se verá más adelante (1,3).

Las células beta comprenden el 75-80% de la población celular en los islotes del páncreas humano.

Este tipo de células, tienen un alto grado de compartimentalización la cual está dada por los gránulos secretorios o gránulos beta, el aparato de Golgi y el RER: los gránulos beta derivan del RER a través del aparato de Golgi, siendo estos gránulos los que contienen y secretan la insulina.

Los gránulos beta tienen una diferente estructura morfológica dependiendo de la especie: en la rata y el ratón son redondos y relativamente densos, con un espacio que separa a los gránulos de los sacos membranosos que los rodean. En las células beta del hombre, el perro y el murciélago, los gránulos tienen perfiles rectangulares con una matriz cristalina conteniendo líneas de periodicidad repetida de aproximadamente 50 Å. En el gato los gránulos beta se encuentran en una estructura cristalina densa romboide rodeados por material amorfo.

**Células Delta:** Estas células constituyen cerca del 10% del total de la población celular de los islotes y son las encargadas de secretar la hormona somatostatina.

Este tipo de células son identificadas por métodos de microscopía electrónica, midiéndose el tamaño de sus gránulos secretores, (250-450 nm) los cuales muestran una opacidad electrónica baja.

**Células PP:** Las células PP son un tipo de células que se encuentran en los islotes en pequeñas cantidades y secretan una hormona llamada polipéptido pancreático, cuya función se cree que es la de regular ciertos procesos gastrointestinales, ya que se ha descubierto que regula la liberación de enzimas digestivas pancreáticas.

**Células C, E y F:** Además de las células descritas anteriormente, se han descrito otros tipos de células cuya función aún es desconocida, como las células C, E y F, las cuales también presentan gránulos secretorios, pero en una proporción mucho menor o inclusive nula, como lo es el caso de las células C, que no contienen dichos gránulos, además de tener mitocondrias muy pequeñas y muy poca porción de RER.

Todos los tipos celulares descritos anteriormente están relacionados muy estrechamente, lográndose con esto la regulación directa de la secreción de algunas hormonas por medio de otras también producidas en los islotes, como el glucagon, que inhibe la secreción de insulina, o la somatostatina, la cual a su vez inhibe la secreción tanto de insulina como de glucagon.

## DIABETES MELLITUS

La diabetes es una enfermedad compleja lo que ha dificultado su clasificación (4). Varias publicaciones contienen información al respecto (5,6). La literatura más reciente ha sido proporcionada por el Dr. Fajans (7).

La diabetes mellitus es una alteración determinada genéticamente del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, asociada con una insuficiencia absoluta o relativa de la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a la insulina. En su expresión clínica total se caracteriza por hiperglucemia en el ayuno, y en la mayoría de los pacientes, a largo plazo, por complicaciones vasculares microangiopáticas, especialmente en el ojo y el riñón, por una frecuencia aumentada de enfermedad macrovascular, tales como enfermedad coronaria y vascular periférica, y por neuropatía. Aunque las principales diferencias fenotípicas en tipos de diabetes clínica (tipo de presentación juvenil, tipo de aparición en la madurez) han sido apreciadas desde hace un siglo, es hasta hace unos doce años que se incrementa el conocimiento de la etiología y patogénesis de la diabetes, aunque todavía incompleta, ha indicado que la diabetes no es una entidad simple sino un grupo heterogéneo de alteraciones.

La heterogeneidad implica que hay diferencias entre varios grupos de pacientes en términos de etiología y patogénesis (factores genéticos, medioambientales e inmunes), en la historia natural, y en la respuesta al tratamiento. Por lo que se considera que la diabetes no es una simple enfermedad sino un síndrome.

Una clasificación ideal de la diabetes tendría que basarse en la etiología y patogénesis solamente, sin embargo, para que una clasificación sea útil: 1) para el clínico, en la categorización de pacientes para propósito de tratamiento y diagnóstico, 2) para propósitos de investigación, y 3) para que sirva como base para la colección de datos clínicos y epidemiológicos en grupos de poblaciones diversas, es conveniente incluir otras consideraciones. En 1979 un grupo de trabajo patrocinado por el Grupo Nacional de Datos de Diabetes (NDDG) de los Institutos Nacionales de Salud de los E.U., publicaron una Clasificación de la Diabetes Mellitus y otras Categorías de Intolerancia a la Glucosa. Esta fue adoptada y modificada ligeramente por la Organización Mundial de la Salud. Fajans (7) ha dado la clasificación más reciente, basada esencialmente en el trabajo y procedimientos del NDDG y de los grupos de trabajo de la Organización Mundial de la Salud, con ligeras modificaciones. Se han revisado los índices por los cuales se idearon las otras clasificaciones, sin embargo, en la actualidad, cualquier clasificación es todavía arbitraria, algunas veces inconsistente y no se apega idealmente a lo que se conoce acerca de la historia natural de varios tipos de diabetes.

#### CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA.

La clasificación (Tabla I) incluye tres clases clínicas: 1) La diabetes mellitus se caracteriza ya sea por hiperglucemia en el ayuno o por niveles de glucosa plasmática por arriba de los límites definidos durante una prueba de tolerancia a la glucosa. 2) Un deterioro en la tolerancia a la glucosa se caracteriza por niveles de glucosa plasmática, durante una prueba de tolerancia a la glucosa, que cursan por arriba de lo normal pero por abajo de aquellos definidos como diabetes. 3) La tercera clase clínica es la diabetes gestacional. La clasificación también incluye dos clases de riesgo estadístico en la historia natural de la diabetes, para propósitos de investigación solamente, en los cuales no hay anomalías del metabolismo de carbohidratos. Hay anomalía previa de tolerancia a la glucosa, y anomalía potencial de tolerancia a la glucosa.

TABLA I

#### CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS

---

##### Clases Clínicas

---

- A. Diabetes Mellitus (DM)
  - I. Tipo I. Tipos dependientes de insulina (IDDM)
  - II. Tipo II. Tipos No-dependientes de insulina (NIDDM)
  - III. Diabetes Mellitus relacionada a desnutrición (MRDM)
  - IV. Otros tipos. Incluyen diabetes mellitus asociada con ciertas condiciones y síndromes

B. Desajustes en la Tolerancia a la Glucosa (IGT)

C. Diabetes Gestacional (GDM)

Clases de riesgo estadístico

---

La clasificación se ha diseñado de modo que un individuo pueda ser clasificado solamente en una de estas clases, sin embargo, un paciente puede cambiar de una clase a otra en la historia natural de la enfermedad.

En esta descripción se indica entre paréntesis la nomenclatura internacional que se emplea en la designación de cada clase de diabetes.

#### CLASES CLINICAS

La Diabetes Mellitus (DM) es subdividida en cuatro diferentes tipos que parecen definir la etiología y patogénesis. La diabetes tipo I y tipo II son las principales formas clínicas de la diabetes en el mundo occidental, mientras que la diabetes relacionada a desnutrición es la principal forma clínica en algunas partes de Africa, Asia y el Caribe. En la cuarta categoría, Otros Tipos, se clasifican varias entidades que, en contradicción a la primaria o diabetes esencial (tipo I y tipo II), anteriormente fueron clasificadas como diabetes secundaria o diabetes asociada con ciertos síndromes genéticos raros.

#### TIPO I: DIABETES MELLITUS INSULINO DEPENDIENTE (IDDM).

La diabetes mellitus tipo I o insulino dependiente (IDDM) se presenta en aproximadamente el 10% de todos los diabéticos en el mundo occidental.

Se piensa que los factores genéticos son de importancia en la mayoría de los pacientes como lo expresa el aumento asociado (o disminución) de la frecuencia de ciertos locus de antígenos de histocompatibilidad (HLA) sobre el cromosoma número 6. En varios grupos occidentales de pacientes diabéticos el porcentaje de prevalencia de HLA-B8, BW15, B18, A1, CW3, DW3, DW4 y particularmente de DR3 y DR4 se ha encontrado aumentado comparado con las poblaciones control, mientras que la frecuencia de B7 y DW2 ha sido encontrada disminuida. Es común que en la diabetes insulino dependiente haya uno o más genes de respuesta inmune en unión desequilibrada con los antígenos HLA que pueden producir susceptibilidad incrementada al daño de células beta permitiendo la interacción de un factor medioambiental con antígenos específicos de la membrana celular. En el tipo más común de IDDM (tipo 1A), se ha postulado que factores medioambientales como ciertas infecciones virales y posiblemente agentes químicos sumados a los factores genéticos pueden conducir a una destrucción de las células beta mediada por células. De tal manera que se piensa que las respuestas inmunes anormales (unidas a asociaciones HLA) caracterizadas por autoinmunidad celular y humoral juegan un papel patogenético después de un factor medio ambiental. Los anticuerpos citoplásmicos circulantes islote-célula (ICA) detectados por inmunofluorescencia y autoanticuerpos contra insulina (IAA), están presentes en aproximadamente 80% de los pacientes, pero desaparecen después de algunos años en la mayoría de ellos. Probablemente son el resultado de un proceso autoinmune, mas que la causa (en muy pocos pacientes una infección viral o daño químico puede conducir a la destrucción de las células beta sin una predisposición genética). Clásicamente, este tipo de enfermedad ocurre más comúnmente en la niñez y en la adolescencia (tipo 1A) (Tabla II); sin embargo, se puede reconocer y puede ser asintomática a cualquier edad. Generalmente hay una aparición repentina, secundaria a una severa insuficiencia de insulina (poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, fatiga), una predisposición a la cetosis, y el paciente se adelgaza. La dependencia de insulina implica que la administración de insulina es esencial para prevenir la cetosis espontánea, coma y muerte. Además de la etapa de predisposición a la cetosis, este tipo de enfermedad se puede reconocer en una etapa más temprana sintomática o asintomática antes de que el paciente llegue a ser cetósico. Por medio de ensayos prospectivos en hermanos asintomáticos de diabéticos insulino dependientes, uno puede aún descubrir pacientes con pruebas de tolerancia a la glucosa y con niveles de glucosa

plasmática elevada en el ayuno. Generalmente en unos dos años, su diabetes progresa rápidamente a la forma cetósica.

En gemelos no diabéticos de pacientes diabéticos tipo I (con una alta proporción de HLA-DR3 o HLA-DR4 positivo), se han encontrado linfocitos T circulantes activados, anticuerpos contra islote-célula y autoanticuerpos contra insulina, por más de 8 años, con disfunción progresiva de las células beta, antes de una más profunda disminución en la actividad secretoria de insulina y la aparición de hiperglucemia en el ayuno.

El segundo tipo de diabetes insulino dependiente (tipo IB) es menos común y se presenta aproximadamente en 10% de todos los casos de IDDM. Se ha pensado que la autoinmunidad primaria está involucrada en la patogénesis de esta forma de diabetes tipo I (Tabla II). Tales pacientes tienen asociada enfermedad endócrina autoinmune, tal como tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, falla gonadal primaria y enfermedades autoinmunes asociadas no endócrinas, tales como anemia perniciosa, enfermedades del tejido conectivo y miastenia gravis, entre otras. Tales pacientes también tienen una alta prevalencia de una historia familiar de enfermedad endócrina y no endócrina autoinmune. La autoinmunidad primaria también puede ser sugerida por la persistencia de títulos altos de anticuerpos pancreáticos islote-célula. La diabetes tipo IB ocurre más frecuentemente en el sexo femenino que en el masculino y aparece como diabetes asintomática, generalmente entre los 30 y 50 años de edad. Aunque la diabetes se puede caracterizar por severa insuficiencia de insulina también se pueden presentar formas no cetósicas más moderadas de diabetes. El reconocimiento de diabetes tipo IB es importante ya que puede alertar al médico de la posible presencia o desarrollo de otra enfermedad

TABLA II

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clase clínica	Subclases	Etapas en la historia natural o evolución	Otra información o explicación
A. Diabetes mellitus (DM)			
I. Tipo I. Tipos dependientes de insulina (IDDM)		1. Predisposición a la precetosis	Anticuerpos positivos, islote-célula (ICA)
	a. Tipo IA: Clásica	a. Diabéticos GTT	
	b. Tipo IB. Autoinmune primaria	b. Hiperglicemia en el ayuno	
		2. Predisposición a la cetosis. Dependiente de insulina	Autoanticuerpos positivos contra insulina (IAA)
		(principales formas clínicas de diabetes)	

autoinmune. Los pacientes con diabetes tipo IB comúnmente tienen una asociación con antígenos de histocompatibilidad DR3, mientras que la diabetes clásica tipo I se caracteriza principalmente por DR4. Sin embargo, ya que hay sobreposición en estos HLA, es probable que no se presente una verdadera heterogeneidad en la diabetes mellitus tipo I en términos de asociación de HLA. A pesar de esto la IDDM parece ser heterogénea en términos de factores genéticos medioambientales y autoinmunes que precipitan la enfermedad.

#### TIPO II: DIABETES MELLITUS NO INSULINO DEPENDIENTE (NIDDM).

El segundo tipo de diabetes, tipo II o diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM), se presenta aproximadamente en el 90% de los diabéticos del mundo occidental, también tiene unas bases genéticas que comúnmente se expresan por un patrón familiar más frecuente de ocurrencia que el que se ve en la IDDM. La sobreposición de factores medioambientales sobre la susceptibilidad genética está indudablemente involucrada en la evolución de la NIDDM. Los pacientes con diabetes tipo II pueden tener un peso corporal que varía de normal a excesivo; la NIDDM ha sido subclasificada de acuerdo a su asociación con la obesidad (Tabla III). El consumo excesivo de calorías que conduce a la ganancia de peso y a la obesidad y la resistencia a la insulina son factores importantes en la patogénesis de la NIDDM en la mayoría de los pacientes occidentales (60 a 80%).

La hiperglucemia del ayuno y la intolerancia a la glucosa generalmente se mejoran o corrigen por pérdida de peso. La obesidad y la resistencia patológica a la insulina no son factores esenciales en la evolución de la NIDDM. En pacientes con NIDDM que no tienen sobrepeso, aún pequeños incrementos en el peso corporal (incluyendo crecimiento normal de la niñez y adolescencia) pueden exacerbar intolerancia a la glucosa y precipitar la hiperglucemia en el ayuno. Sin embargo, se ha presentado la evidencia de que la ausencia o presencia de obesidad puede dar la diferencia entre distintas formas de NIDDM. Analizando la diabetes no insulino dependiente se ha encontrado que la prevalencia de diabetes en gemelos es más alta en individuos no obesos que en obesos. También se ha encontrado que los pacientes con obesidad definida en alguna época de su vida tenían una frecuencia más baja de historia familiar de diabetes y una baja prevalencia de diabetes en sus padres que los pacientes sin obesidad, apoyando el concepto de que la presencia o ausencia de obesidad puede marcar grupos heterogéneos de diabéticos dentro de la diabetes tipo II.

En la mayoría de los pacientes con diabetes tipo II se hace un diagnóstico a mediana edad. Una subclase de NIDDM incluye familias en las cuales la diabetes se puede reconocer en niños, adolescentes y adultos jóvenes, la cual se ha designado como tipo de diabetes juvenil que aparece en la edad adulta o MODY (Maturity-onset type diabetes of young people) (Tabla III). La herencia autosómica dominante de la diabetes ha sido establecida en la MODY; la mayor parte de la NIDDM no se hereda de esta manera. Aunque la MODY fue excluida como una subclase por la clasificación del NDDG, se ha concluido que la MODY es solamente una forma de diabetes en la cual se ha establecido un modo definido de herencia.

En contradicción a la diabetes tipo I, no se han encontrado asociaciones de antígenos HLA en la mayoría de poblaciones con diabetes tipo II. Por otro lado en tres grupos de poblaciones específicas se ha asociado un antígeno HLA con NIDDM (Dimas, HLA-A2, Xhosas, HLA-A2, Fijians, HLA-Bw6).

Ninguna asociación ha sido encontrada entre los antígenos específicos de HLA y MODY a pesar de un reporte inicial que demostró lo contrario. La evidencia de una inmunidad celular y la presencia de ICA e IAA características de la diabetes tipo I no se han encontrado en la diabetes tipo II.

La MODY puede ser diagnosticada en una edad joven, por abajo de los 25 años de edad, y frecuentemente en la adolescencia temprana (9-14 años de edad),

TABLA III

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS  
DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clase clínica	Subclases	Etapas en la historia natural o evolución	Información adicional o explicación
A. Diabetes Mellitus			
II. Tipo II. Tipos no dependientes de insulina (NIDDM)			
	a. NIDDM en el obeso b. NIDDM en el no obeso	1. No hay requerimiento de insulina *	a. Diabético GTT b. Hiperglicemia en el ayuno
	c. MODY-NIDDM en el joven más herencia dominante autosómica	2. Requerimiento de insulina *	MODY: Tipo de diabetes juvenil que aparece en la edad adulta (Maturity-onset type diabetes of young people)

\* Principales formas clínicas de diabetes

particularmente si se ha tenido noticia por pruebas de rutina de glucosa plasmática en las generaciones más jóvenes de familias con más de una generación de NIDDM. Otros investigadores han usado un límite superior de menos de 30 a 35 años de edad para una definición de NIDDM en el joven. La MODY generalmente es asintomática en grupos de edad más joven, aunque algunos pacientes pueden tener síntomas, particularmente, si se acentúa por una infección. De modo que, a menos que la investigación se lleve a cabo por ensayo prospectivo, un diagnóstico clínico de diabetes no se hace frecuentemente en la mayoría de los miembros de familias caucásicas hasta la mediana edad o en la adulta tardía, o aún en la vejez, como en otros tipos de NIDDM.

Por estudios seriados de miembros jóvenes de familias con MODY, se puede demostrar que puede haber muy bajo progreso hacia un deterioro en la tolerancia a la glucosa y de esta fase a la glucosa diabética con niveles normales de glucosa en el ayuno (hasta los 18 años); y sin avance o muy bajo progreso de aquel estado a hiperglucemia en el ayuno (hasta 27 años). La severidad en la tolerancia a los carbohidratos puede fluctuar por muchos años, particularmente en pacientes con anormalidades antes de la presentación persistente de

hiperglucemia en el ayuno. Esto no representa pobre reproducibilidad de las pruebas de tolerancia a la glucosa sino variaciones en la expresión de la enfermedad. Otro tipo de MODY tiene hiperglucemia en el ayuno y/o progreso más rápido en una edad temprana. De modo que alguna diabetes MODY puede ser diagnosticada en los 19 o inicio de los veinte años por síntomas comunes de diabetes descompensada, particularmente en pacientes obesos. Los pacientes MODY de la India que residen en el Sur de Africa y en la región Sur occidental de la India son inicialmente sintomáticos con hiperglucemia en el ayuno al diagnóstico. La anormalidad en el metabolismo de los carbohidratos, incluyendo hiperglucemia en el ayuno, aún aquella que ocurre en algunos pacientes en una edad más joven (10-14 años), responde a terapia de dieta o dieta y agentes orales por muchos años.

Después de varias décadas, inclusive, la hiperglucemia del ayuno puede no responder por más tiempo a sulfonilureas y puede progresar a diabetes que requiere insulina (no insulino dependiente o cetósica) con disminución de insulina basal y estimulada por nutrimentos y niveles de péptido C.

En contraste a la presentación asintomática y engañosa en pacientes caucásicos, resumida anteriormente, se ha descrito un síndrome de diabetes sintomática atípica en jóvenes americanos de raza negra que tiene características de MODY. Estos pacientes se presentan con un síntoma diabético agudo que se revierte con insulina pero que meses o años más tarde cursa con dependencia de insulina. Esta diabetes no-autoinmune puede ser confundida con IDDM debido a su presentación clínica relativamente aguda, pero se puede distinguir de la IDDM clásica por sus características clínicas, familiares, inmunológicas, genéticas y metabólicas.

Los pacientes con MODY frecuentemente son no obesos, particularmente en grupos de edades más jóvenes, aunque la obesidad ocurre en otros grupos en una frecuencia de 25 a 55%.

En muchas familias y poblaciones MODY se presentan complicaciones microangiopáticas y macroangiopáticas típicas con una frecuencia similar a los patrones vistos en pacientes con NIDDM. De modo que la MODY no es una forma inocua de hiperglucemia. Las complicaciones vasculares que ocurren, frecuentemente se encuentran hasta la madurez o en la vejez, aunque pueden ser detectadas en algunos pacientes alrededor de los treinta años o a edades más tempranas.

Los pacientes con NIDDM son no dependientes de insulina para la prevención de cetosis (por ejemplo, ellos son cetosis-resistentes o no predispuestos a cetosis) pero pueden requerir insulina para la corrección de hiperglucemia del ayuno persistente sintomática o no sintomática si esta no se puede lograr con el uso de dieta o agentes orales. De modo, que la administración terapéutica de insulina no distingue entre IDDM y NIDDM. Ocasionalmente es difícil distinguir pacientes no-obesos con NIDDM tratados con insulina de los verdaderos pacientes con IDDM (predisposición a la cetosis). Los pacientes con NIDDM pueden aún desarrollar cetosis bajo circunstancias de estrés severo precipitado por infecciones o trauma. Generalmente otros factores, tales como la edad de presentación, historia familiar de diabetes, curso clínico, o historia natural (rapidez de progreso en la severidad, fluctuaciones en los niveles de glucosa plasmática, frecuencia de reacciones, frecuencia de cetonuria) ayudará en la propia clasificación. Una investigación a fondo de la respuesta del péptido C a la glucosa o glucagon y la presencia o ausencia de ICA pueden también ser de ayuda. Como en otros pacientes NIDDM, la hiperglucemia puede ser corregida sin la administración de insulina por terapia con dieta o dieta con agentes orales.

#### DIABETES MELLITUS ASOCIADA A DESNUTRICION (MRDM).

La diabetes relacionada a desnutrición (MRDM) se presenta en algunas partes del

mundo con menos frecuencia que la IDDM y se puede aproximar a la frecuencia de la NIDDM. La mayor parte de casos se localizan en la India y ciertas partes de Africa. Se presenta generalmente en la gente joven y se caracteriza por desnutrición proteínica severa y enflaquecimiento, en algunos pacientes por la presencia de cálculos pancreáticos (Tabla IV). La diabetes de estos pacientes se caracteriza por marcada hiperglucemia que no se acompaña por cetosis. Estos individuos requieren insulina para la preservación de su salud, aunque no dependen de insulina para la prevención de cetosis. En un estudio realizado en pacientes de la India Sudoccidental se demostró que las concentraciones de péptido C son más bajas en pacientes con este tipo de diabetes que en pacientes con NIDDM, pero más altas que los de IDDM clásica.

TABLA IV

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS  
DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clase clínica	Subclases	Etapas en la historia natural o evolución	Información adicional o explicación
A. Diabetes Mellitus (DM)			
III. Diabetes mellitus relacionada a la desnutrición (MRDM)*	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Diabetes pancreática fibrocalculosa</li> <li>b. Diabetes por deficiencia de proteínas</li> </ul>		Depende de insulina para vivir, no para prevenir cetosis

\* Principal forma clínica en regiones de Africa, Asia y el Caribe

OTROS TIPOS DE DIABETES.

Otros tipos de diabetes incluyen entidades secundarias a o asociadas con otras condiciones o síndromes (Tabla V). Esta subclase puede ser dividida de acuerdo a las relaciones etiológicas conocidas o sospechadas. La diabetes puede ser secundaria a una enfermedad pancreática o a la remoción de tejido pancreático; secundaria a enfermedad endócrina, tal como acromegalia, síndrome de Cushing, feocromocitoma, glucagonoma, somatostatina y aldosterismo primario; secundario a la administración de ciertos fármacos (drogas antihipertensivas, tiazidas diuréticas, preparaciones que contienen estrógenos, drogas psicoactivas, agentes simpatomiméticos, etc.). La diabetes (o deterioro en la tolerancia a la glucosa) puede estar asociada con un gran número de síndromes genéticos. Finalmente, la diabetes puede estar asociada con defectos genéticos de receptores de insulina, los cuales pueden ser el resultado ya sea de anomalías en el número o afinidad de receptores de insulina o debido a anticuerpos para receptores de insulina con o sin alteraciones inmunes asociadas.

TABLA V

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS  
DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clase clínica	Subclases	Etapas en la historia natural o evolución	Información adicional o explicación
A. Diabetes Mellitus (DM)			
IV. Otros tipos, incluyen diabetes mellitus asociada con ciertas condiciones y síndromes	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Enfermedad pancreática</li> <li>2. Etiología hormonal</li> <li>3. Inducción química o por fármacos</li> <li>4. Ciertos síndromes genéticos</li> <li>5. Anormalidades en el receptor de insulina</li> <li>6. Otras condiciones diversas</li> </ol>		

DESAJUSTES EN LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA (IGT).

El NDDG de los E.U. ha recomendado que sea establecida una categoría para individuos que en el ayuno y durante la prueba de tolerancia a la glucosa tienen niveles de glucosa sanguínea que cursan entre lo normal y la diabetes. En algunos individuos un desajuste en la tolerancia a la glucosa puede representar una etapa en la historia natural de la IDDM, y mucho más frecuentemente de NIDDM como se ha demostrado por ensayos prospectivos. En tales pacientes la conversión de tolerancia deteriorada a la glucosa a NIDDM, y particularmente a NIDDM con hiperglucemia en el ayuno, ha tomado años o décadas. Se ha encontrado que ocurre en 10% a 50% de los pacientes con desajustes en la tolerancia a la glucosa después de unos 10 años. Para estos pacientes se ha establecido la categoría de desajustes o deterioro en la tolerancia a la glucosa (IGT) (Tabla VI).

Aunque clínicamente están ausentes importantes complicaciones de la diabetes en riñón y retina (microangiopatía) o es muy rara en pacientes con IGT, muchos estudios han mostrado en tales grupos un aumento en la tasa de muerte e incremento en la prevalencia de enfermedad arterial, anormalidades electrocardiográficas o susceptibilidad incrementada a enfermedad aterosclerótica asociada con otros factores de riesgo conocidos, entre los que se incluye hipertensión, hiperlipidemia y adiposidad. De modo que el desajuste en la

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS  
DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clase clínica	Subclases	Etapas en la historia natural de la enfermedad o evolución	Información adicional o explicación
B. Desajustes en la tolerancia a la glucosa (IGT)	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. IGT en el obeso</li> <li>b. IGT en el no-obeso</li> <li>c. IGT en el MODY</li> <li>d. IGT asociada con ciertas condiciones y síndromes:               <ul style="list-style-type: none"> <li>1. Enfermedad pancreática</li> <li>2. Etiología hormonal</li> <li>3. Inducida por drogas o químicamente</li> <li>4. Ciertos síndromes genéticos</li> <li>5. Anormalidades en el receptor de insulina</li> <li>6. Otras condiciones diversas</li> </ul> </li> </ul>		Anticuerpos positivos, islote-célula en DM tipo I

*tolerancia a la glucosa, particularmente en aquellos individuos alrededor de los 50 años de edad (condición apropiada para el uso de pruebas de tolerancia a la glucosa) pueden tener implicaciones pronósticas, deberían no ser ignorados o tomados a la ligera. En el obeso, los desajustes en la tolerancia a la glucosa casi invariablemente revierten a tolerancia normal a la glucosa con reducción en el peso. El deterioro en la tolerancia a la glucosa puede también asociarse con las condiciones y síndromes enlistados en la sección Otros Tipos de Diabetes (Tabla V).*

DIABETES GESTACIONAL.

*Las pacientes con diabetes mellitus gestacional (GDM) muestran intolerancia a la glucosa durante el embarazo (Tabla VII). Una persona diabética que se llega a embarazar no se clasifica como GDM. Desde un punto de vista bioquímico (niveles plasmáticos de glucosa) el desajuste en la tolerancia a la glucosa durante el embarazo es similar pero no idéntico a la IGT. La diabetes gestacional se presenta en aproximadamente el 2% de todos los embarazos y está asociada con morbilidad y mortalidad perinatal incrementada y elevada frecuencia de pérdida de fetos viables. La terapia de este grado de intolerancia a la glucosa puede prevenir mucho de esto. La diabetes gestacional generalmente retorna a un estado de tolerancia normal de la glucosa después del parto; aún así, 60% de tales mujeres desarrollan diabetes dentro de los 15 años posteriores. Así que, después de la terminación del embarazo, las pacientes con diabetes gestacional deberían ser reclasificadas como pacientes de tolerancia deteriorada a la glucosa, diabetes mellitus, o anomalía previa de tolerancia a la glucosa.*

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS  
DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clase clínica	Subclases	Etapas en la historia natural de la enfermedad o evolución	Información adicional o explicación
C. Diabetes gestacional			Puede ser precursora de la diabetes tipo II o tipo I

CLASES DE RIESGO ESTADISTICO.

Hay sujetos con tolerancia a la glucosa normal que han tenido una alteración de la tolerancia en el pasado (diabetes, IGT o GDM), o quienes tienen una relación genética estrecha con un diabético y tienen un alto riesgo de desarrollar diabetes en el futuro, para clasificar estos individuos inicialmente desde un punto de vista de investigación, se establecieron dos clases de riesgo estadístico por el NDDG: (1) anormalidad previa de tolerancia a la glucosa (PreAGT), y (2) anormalidad potencial de tolerancia a la glucosa (PotAGT) (Tabla VIII).

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS  
DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clases clínicas	Subclases	Etapas en la historia natural o evolución	Información adicional o explicación
Clases de riesgo estadístico			
A. Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa (PreAGT)			
B. Anormalidad potencial de tolerancia a la glucosa (PotAGT)			Anticuerpos islote-célula positivos, primera fase disminuida de la respuesta de insulina en DM tipo I.

*ANORMALIDAD PREVIA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (PreAGT).*

La clasificación de anormalidad previa de tolerancia a la glucosa (PreAGT) está restringida a individuos que previamente tuvieron hiperglucemia diabética o desajustes en la tolerancia a la glucosa pero que actualmente su tolerancia es normal. Las mujeres que han tenido diabetes gestacional pero han vuelto a la normalidad después del parto son ejemplos, como lo son los individuos que fueron obesos y cuya diabetes o deterioro en la tolerancia a la glucosa retornó a lo normal después de la pérdida de peso. Los pacientes con tolerancia alterada a la glucosa o diabetes media de la forma NIDDM, particularmente entre pedigrees de tres o más generaciones de diabéticos heredados en una forma autosómica dominante (MODY), puede fluctuar entre tolerancia disminuida a la glucosa, diabetes, y normal (PreAGT), con poco o sin cambio en el peso. Se han descrito remisiones espontáneas de diabetes tipo I pero son generalmente de naturaleza temporal. Todos estos individuos tienen un riesgo incrementado de desarrollar diabetes en el futuro.

*ANORMALIDAD POTENCIAL DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (PotAGT).*

Los individuos en la clase de anormalidad potencial de tolerancia a la glucosa (PotAGT) nunca han exhibido tolerancia anormal, pero han incrementado sustancialmente el riesgo para el desarrollo de la diabetes. La PotAGT identifica el intervalo de tiempo desde la concepción hasta la primera demostración de intolerancia a la glucosa en un individuo predispuesto a diabetes sobre bases genéticas. Los factores asociados con un riesgo incrementado para IDDM incluyen los que son hermanos o gemelos de un paciente con IDDM, teniendo halotipos de histocompatibilidad idénticos a aquellos de un pariente de primer grado con IDDM, particularmente un hermano, que posea anticuerpos circulantes islote-célula y autoanticuerpos contra insulina y una respuesta disminuida a la insulina en la primera. Los factores asociados con riesgo incrementado para NIDDM incluyen un pariente de primer grado de un diabético tipo II, particularmente en una familia de MODY, obesidad asociada con una historia familiar de diabetes, una mujer con antecedentes de haber dado nacimiento a un hijo con un peso al nacimiento de más de 4 kg y de ser miembro de un grupo racial o étnico con alta prevalencia de diabetes (ej. ciertas tribus de indios americanos o habitantes de las islas del Pacífico). Un riesgo particularmente fuerte para desarrollar NIDDM es ser gemelo monocigótico de un paciente con NIDDM o un hijo de dos padres diabéticos NIDDM. Se ha encontrado concordancia de la diabetes en más del 90% de pares de hermanos monocigóticos de pacientes con NIDDM.

Los términos "prediabetes" y "diabetes potencial" deberían ser utilizados solo retrospectivamente para referirse al período previo al diagnóstico de la diabetes. Esto no puede ser usado prospectivamente ya que ahora se sabe que la diabetes ocurre primariamente en aquellos en quienes un factor medioambiental precipitante llega a sobreponerse sobre una predisposición genética. El hallazgo de anticuerpos islote-célula en un gemelo idéntico de un paciente diabético tipo I no puede ser tomado como prueba para el desarrollo tardío de diabetes.

La PotAGT nunca debería ser aplicada como diagnóstico a un individuo. Se incluye en esta clasificación para identificar individuos o grupos de individuos para estudios de investigación prospectiva.

**TRATAMIENTO**

Aunque ya se ha mencionado en la descripción de cada tipo de diabetes el

tratamiento que se sigue y el tipo de respuesta que se tiene, aquí se da información adicional.

El tratamiento de la diabetes se aplica de acuerdo a la naturaleza de la enfermedad y a la eficacia de los regímenes terapéuticos disponibles, tratando de restaurar lo mayor posible la fisiología del paciente. El tratamiento para un diabético, debe de incluir al menos dos de los siguientes puntos:

- 1) Educación.
- 2) Ejercicio.
- 3) Dieta.
- 4) Medicamentos orales.
- 5) Insulina.

La educación de un diabético debe incluir desde el tipo de dieta que debe de seguir, la dosis de medicamento que debe utilizar, que tan seguido debe de administrarse este durante el día, hasta el tipo de diabetes que presenta el paciente y los efectos que le causan en su organismo.

En cuanto al ejercicio físico se ha encontrado que mejora el efecto de otros tratamientos además de que reduce los requerimientos de insulina haciendo a ésta más efectiva, probablemente mejorando la función de los receptores de insulina.

La dieta se da en forma individual para adaptarse a las necesidades de cada paciente. Debe ser nutritiva y bien equilibrada, teniendo como meta la reducción de peso en pacientes obesos mediante la disminución calórica, sobre todo en pacientes con IDDM.

De entre los medicamentos, los hipoglucemiantes orales (sulfonilureas), son los que mayor uso tienen ya que estimulan la producción de insulina en los islotes de Langerhans. La administración de sulfonilureas, en el diabético no obeso, restaura la fase inicial de liberación de insulina; no se recomienda para diabéticos insulino dependientes, ya que estos medicamentos dependen de la función de las células beta para producir su efecto sobre el nivel de glucosa en sangre. Algunos ejemplos de sulfonilureas son los siguientes: Tolbutamida, Clorpropamida, Acetohexamida, etc.

La administración de insulina, está indicada para los diabéticos tipo I y para diabéticos tipo II en etapas avanzadas.

Existen diferentes preparaciones comerciales de insulina que varían con respecto a la que se obtiene de la especie animal en cuanto a pureza y solubilidad, también difieren en el tiempo de inicio y duración de su efecto biológico, además de que la mayoría de las preparaciones de insulina contienen impurezas las cuales aumentan la inmunogenicidad de la insulina por lo que hasta ahora no ha sido satisfactorio el resultado del tratamiento por restitución de insulina (6).

### **HIPERGLUCEMIA EXPERIMENTAL**

La inducción de la diabetes ha sido lograda por diversas técnicas experimentales. La pancreatectomía condujo a la diabetes y fue una observación clave en el estudio de esta enfermedad. En la actualidad los avances científicos y tecnológicos permiten la realización de estudios inclusive a nivel molecular.

Las hormonas epinefrina, glucagon, glucocorticoides y somatotropina, tienen un efecto antagonista sobre la insulina. Cuando están presentes en exceso como una respuesta al estrés o como una consecuencia patológica de un tumor u otros

desajustes metabólicos, la tolerancia a la glucosa es reducida pudiendo presentarse hiperglucemia. La epinefrina y el glucagón ejercen el mismo efecto contra-insulina en animales y humanos cuando se administran en exceso. También la administración de hidrocortisona y hormona adrenocorticotrópica inducen hiperglucemia e hiperplasia en las células beta.

En los animales y el hombre, las lesiones hipotalámicas pueden causar obesidad. Los mejores modelos animales estudiados para este síndrome son la rata y el ratón, con lesiones en el núcleo ventromedial del hipotálamo. Estas lesiones pueden ser electrolíticas o químicas. Las ratas adultas sometidas a estos procedimientos presentan obesidad, hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina.

El papel de los virus en la patogénesis de la diabetes en los animales es incierta. Aunque la presencia de partículas virales ha sido informada en los animales espontáneamente diabéticos, principalmente en ratones db/db, aunque la etiología viral no está todavía comprobada. La mayoría de los virus contienen RNA, entre los que se incluye al de la rubéola, encefalitis, miocarditis y la enfermedad de pie y boca, siendo específicos de especie. La variante M del virus de la encefalomiocarditis de los ratones es de los modelos más importantes. La inyección de este virus en ciertas cepas de ratones adultos, causa diabetes no dependiente de insulina en casi el 40% de estos animales.

#### INDUCCIÓN QUÍMICA

El uso de agentes químicos para producir diabetes, permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos, hormonales y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético. Existen varias clases de agentes químicos. Los primeros son sustancias tóxicas célula-específicas que destruyen a las células beta y causan un estado de deficiencia primaria de insulina. El segundo grupo lo constituyen agentes que actúan sobre células beta pero no las destruyen. Una tercera clase incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitan al páncreas y como consecuencia se produce la diabetes. Este último grupo incluye a las hormonas contra insulina, anticuerpos anti-insulina y algunos agentes quelantes, particularmente de zinc.

Los dos agentes que han sido más ampliamente usados son la aloxana y la estreptozotocina. Estos compuestos en dosis diabéticas actúan específicamente sobre las células beta. Solamente en el hámster chino se ha sugerido que la estreptozotocina puede dañar a la célula alfa además de la beta.

#### ALOXANA

Aunque desde hace muchos años se conoce la actividad diabética de esta sustancia, el mecanismo de acción es aún desconocido. Algunas evidencias indican que el efecto inicial de la aloxana es mediado de alguna forma por una interacción a nivel de membrana de la célula beta. Otros estudios en los que se ha utilizado aloxana marcada con <sup>14</sup>C han revelado que hay una alta afinidad de la droga por las membranas de las células del islote. Existen también evidencias en los cambios de permeabilidad de la membrana que podrían explicar la necrosis selectiva.

Es interesante hacer notar que ciertos azúcares protegen a un animal contra los efectos de la aloxana. La glucosa y en menor grado la fructosa y la manosa, cuando se administran antes de la aloxana, pueden prevenir o aminorar la subsecuente hiperglucemia. El efecto protector de los azúcares ha sido relacionado con propiedades estereoespecíficas lográndose un mejor efecto con anómeros alfa. Otro aspecto importante es la ausencia de respuesta a la aloxana en el cuyo. Se ha encontrado que las células beta de este animal carecen de

zinc, y puede ser que la interferencia con el metabolismo de este oligoelemento sea importante para la acción de esta droga.

En ocasiones puede no producirse diabetes con la aloxana en animales que normalmente desarrollan esta respuesta, aún cuando esta sea utilizada en dosis recomendables. Esto puede ser debido al uso de preparaciones "envejecidas" de aloxana, ya que algunos reportes indican que el uso de esta sustancia que se ha mantenido almacenada por períodos de cinco años o más, puede causar falla renal y muerte temprana antes de que aparezcan cambios en la glucemia. Esto ha sido atribuido a contaminantes que resultan de su oxidación (color rosa).

#### ESTREPTOZOTOCINA

La estreptozotocina es una sustancia química relativamente selectiva para células beta que en ciertas especies de animales causa diabetes permanente. La fijación a la membrana a semejanza con la aloxana es el primer evento en el proceso patológico. Hay evidencias que indican que la toxicidad de la droga está mediada por el reconocimiento específico de algunos receptores sobre la célula beta. Dentro de las células beta se cree que la estreptozotocina provoca la disminución de los niveles del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), ya que puede tanto disminuir su síntesis como incrementar su hidrólisis. La nicotinamida protege a los animales contra la citotoxicidad tanto de estreptozotocina como de aloxana. Los efectos de esta última pueden ser prevenidos por algunos carbohidratos, siendo la 3-O-metil glucosa el más efectivo.

#### **L-ARGININA**

La L-arginina o ácido alfa amino-gama guanidin-valeriánico, es un aminoácido que ha sido considerado como semiesencial para los mamíferos y las aves ya que aún cuando lo sintetizan, también lo requieren en la dieta para mantener niveles adecuados en el organismo, sobre todo en las etapas tempranas del desarrollo, para sostener una síntesis activa de proteínas y para la realización de múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos. Como veremos más adelante, este aminoácido sigue varios destinos metabólicos y ésta es una de las razones por las que sus niveles plasmáticos pueden detectarse bajos en un momento dado. Algunos órganos y tejidos pueden requerir de un mayor aporte de L-arginina por las funciones que desempeñan, tal es el caso del hígado y del páncreas.

La participación de la arginina en la liberación de las hormonas pancreáticas, ha sido estudiada exhaustivamente no sólo *in vivo*, empleando diferentes modelos experimentales, sino también en sistemas *in vitro*, en los cuales se ha trabajado con islotes de Langerhans y con diferentes células aisladas que los constituyen, particularmente, con las células beta productoras de insulina.

Varios intermediarios derivados de la arginina se han descrito como participantes en la respuesta a este aminoácido. Pero este aminoácido también forma parte de otras moléculas.

#### **METABOLISMO DE ARGININA**

El metabolismo de la arginina ocurre por dos mecanismos que son complementarios. El primero de ellos implica la hidrólisis enzimática, que ocurre por acción de la arginasa no sólo en el ciclo de la urea, sino también en tejidos extrahepáticos y que lleva a la formación de ornitina y urea. El segundo,

lo constituye la desaminación oxidativa, proceso por el cual, se conserva el radical guanidínico y hace posible su utilización en la síntesis de creatina (8) y de otros productos con gran actividad biológica.

En primer lugar este aminoácido participa en el ciclo de la urea donde se elimina el amoníaco formado por la desaminación oxidativa de los aminoácidos, el cual es desechado en la orina en forma de urea. Pero también participa directamente en la formación de tejido conjuntivo al formarse a partir de ella prolina e hidroxiprolina, aminoácidos importantes para la síntesis de colágena.

La arginina también es un aminoácido glucogénico, ya que por oxidación produce alfa cetoglutarato, un intermediario de la síntesis de novo de glucosa.

Junto con la glicina y la metionina, la arginina participa en la síntesis de creatina, compuesto clave en el almacenamiento de grupos fosfato en forma de fosfocreatina en tejido muscular y nervioso. Otros metabolitos importantes que derivan de la arginina se presentan en la figura 2.

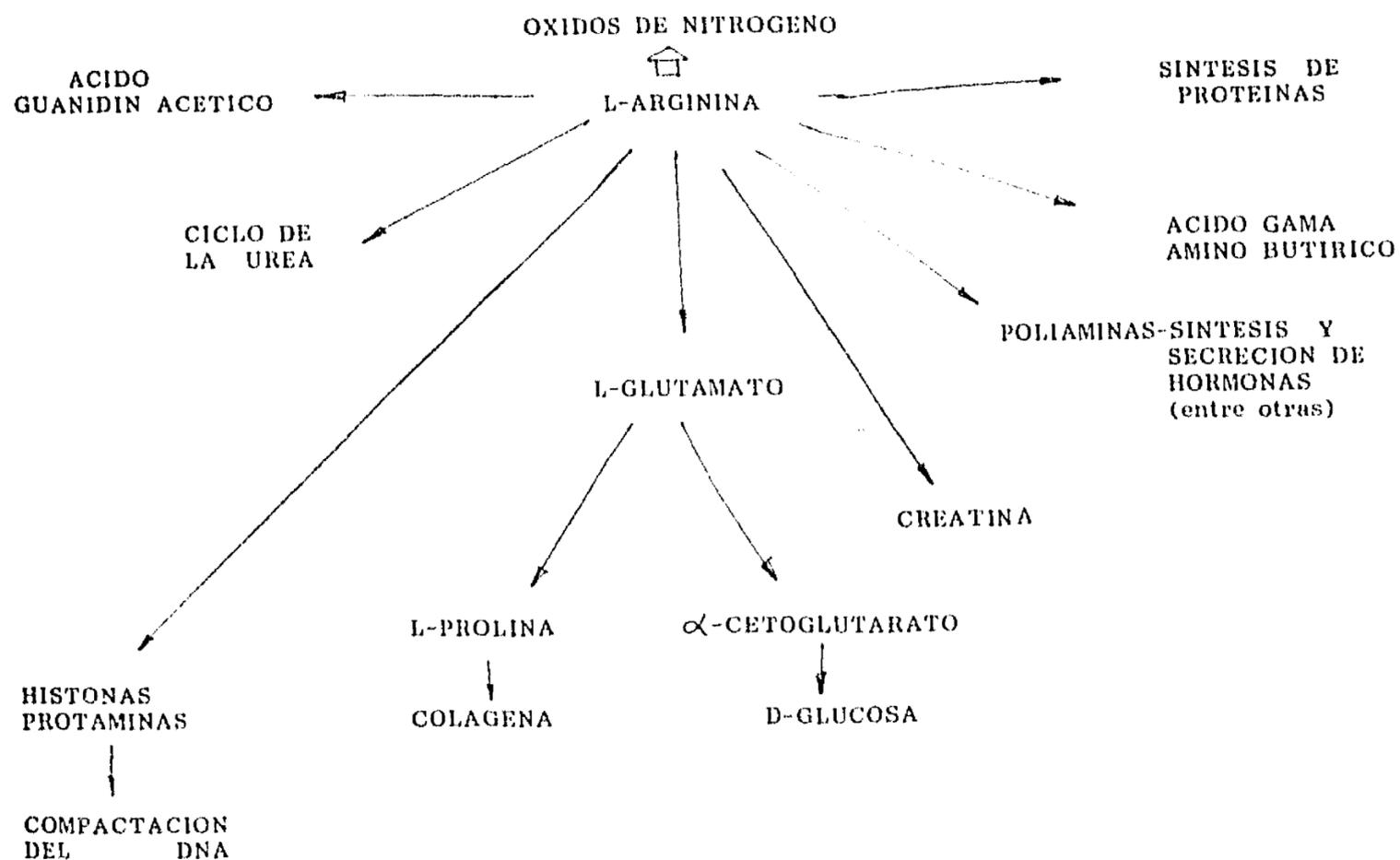


Figura 2. Esquema general que muestra el destino metabólico de la L-arginina.

Otro aspecto importante de la arginina, es su participación en la compactación del DNA ya que este aminoácido forma parte de las histonas y protaminas,

constituyendo junto con la lisina la cuarta parte del número total de residuos de aminoácidos en las histonas, siendo las histonas H3 y H4 las que presentan la mayor cantidad de arginina. La función de la arginina en las histonas, es la de dar una carga positiva a esta proteína a pH neutro para que se pueda combinar con el DNA duplohelicoidal dando complejos DNA-histona, los cuales como se sabe, son una manera de compactar la cadena de DNA en células eucariontes y tienen gran importancia en los procesos reproductivos (9,10).

Las protaminas constituyen otro grupo de péptidos que contienen hasta un 60% de arginina, por lo que muestran todavía mayor afinidad que las histonas por los grupos con carga negativa. Localizándose particularmente en el núcleo de células espermáticas.

#### L-ARGININA Y SU ACCION EN EL PANCREAS

También se ha encontrado que la arginina interviene en la estimulación de la producción de insulina en páncreas normal y en enfermedades pancreáticas donde hay una función secretoria remanente de las células beta como en la pancreatitis aguda y en diabetes secundaria o en fases iniciales de la diabetes tipo I (11-13).

La respuesta del páncreas a la arginina es dependiente de la edad, siendo menor a medida que avanza ésta, como se ha demostrado en estudios realizados con ratas de 1.5, 2 y 12 meses de edad (14,15).

Además de intervenir en la estimulación de la producción de insulina, la arginina interviene en la biosíntesis de esta hormona, ya que forma parte del péptido C en los residuos número 31, 32 y 65 de la cadena primaria de la proteína, los cuales son los sitios donde ocurre la hidrólisis del péptido por tripsinas, para la liberación de la insulina del péptido C en las últimas fases de la síntesis de insulina.

La arginina tiene un papel muy importante en la producción de hormonas endócrinas pancreáticas, ya que se ha demostrado, que este aminoácido estimula en mayor o menor grado a las células alfa, beta y delta del páncreas en la liberación de sus respectivas hormonas (15-17). De entre estos tres tipos de células las que mejor responden a la estimulación con arginina son las células beta de los islotes de Langerhans, ya que a concentraciones máximas de 20mM la liberación de insulina en ratas normales es de 10 ng/ml, en cambio la liberación de glucagon por células alfa al mismo estímulo de arginina es de 3.4 ng/ml (18,19).

Esta concentración de arginina se ha probado para somatostatina, producida por las células delta del páncreas, pero se ha demostrado que a una concentración de arginina de 10mM, se produce una liberación de somatostatina de 40 pg/ml, mientras que para insulina es de 18 ng/ml y para glucagon de 2 ng/ml (16).

Esta estimulación es dependiente de la dosis administrada (20), y es potenciada al utilizarse D-glucosa en un rango de concentración de 3-27 mM (13), fructosa 16.7 mM o potasio 10 mM (16), siendo la cantidad de insulina liberada dependiente de la concentración de arginina administrada como se menciona anteriormente, este efecto puede observarse en la figura 3 (21).

Se cree que el potasio causa la liberación de la insulina por una despolarización de la membrana plasmática, abriendo los canales de calcio, sensibles a los cambios de voltaje. En presencia de arginina, el potasio estimula la producción de insulina e inhibe la producción de glucagon, cerrando posiblemente los canales de calcio de las células alfa (22).

La liberación de la insulina, también está relacionada con el calcio.

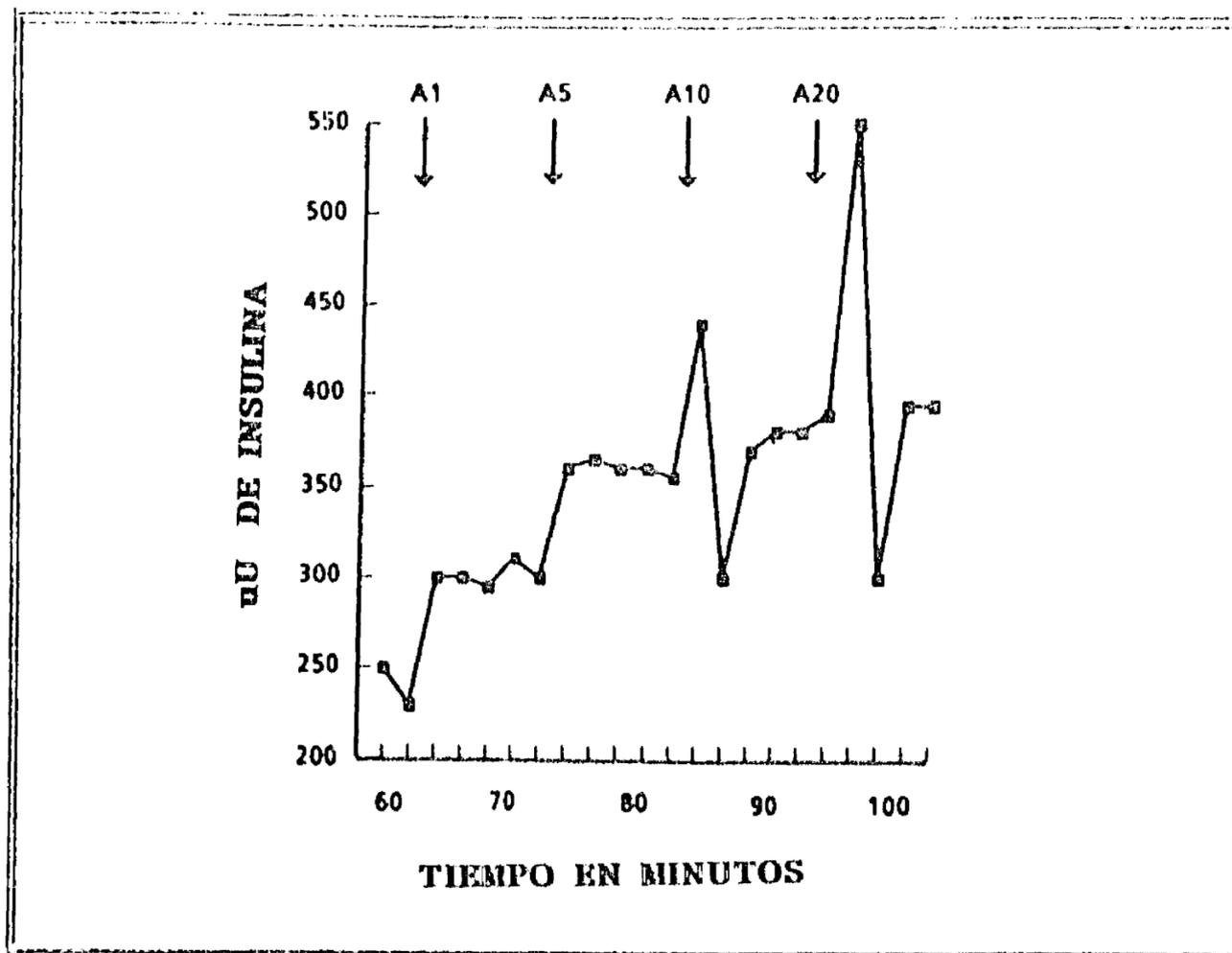


Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones milimolares de L-arginina sobre la liberación de insulina en páncreas de rata. A1-A20 significa diferentes concentraciones de arginina. (Adaptado de la referencia 21).

La estimulación de la secreción de insulina por glucosa, sulfonilureas y potasio, está asociado con un aumento en el calcio citoplásmico en las células beta pancreáticas. Estas acciones están mediadas por la despolarización y flujo del calcio a través de los canales sensibles a los cambios de voltaje. Además el AMPc, al parecer sensibiliza la maquinaria secretoria en la señal de calcio.

En las células beta, el aumento de calcio inducido por la glucosa, es precedido por una disminución inicial de este catión, lo cual se atribuye a un secuestro intracelular y a un transporte al exterior. Esta reducción en el calcio en la célula beta, provoca una inhibición de la liberación de insulina (23).

La respuesta del páncreas a la administración de arginina en el estado diabético junto con una potencialización hiperglicémica, se considera como un indicativo de la disminución de la capacidad secretoria de insulina por parte del páncreas.

Es muy probable, que este aminoácido, sea metabolizado dentro de las células beta de los islotes de Langerhans, ya que se ha demostrado que en islotes transplantados a hígado de rata la arginina también los estimula para la producción de insulina. La secreción de insulina estimulada por arginina, es de la misma naturaleza que la provocada por glucosa, ya que también es bifásica, como puede observarse en la figura 4 (24).

La glucosa (27.7 mM) y la arginina 8 mM estimulan la secreción de insulina en

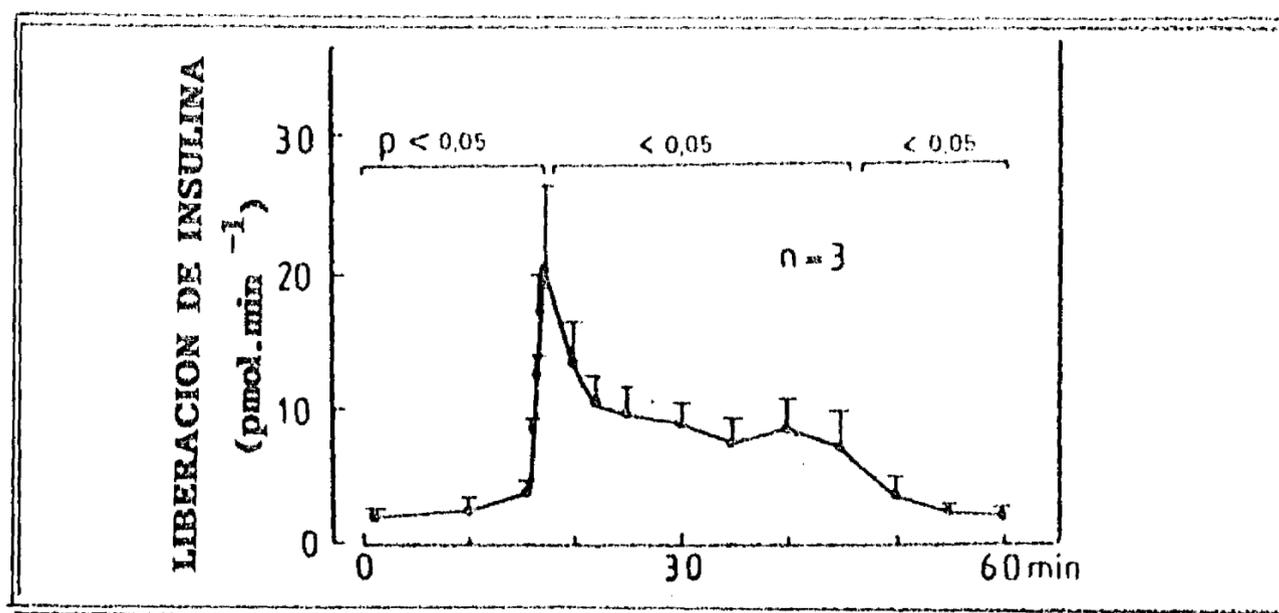


Figura 4. Respuesta bifásica de la secreción de insulina estimulada por L-arginina 30 mM y glucosa 3 mM.

páncreas de ratas normales. Cuando una infusión inicial de arginina es seguida de una segunda administración del aminoácido aproximadamente a los 50 minutos después de la primera administración, la respuesta de insulina al aminoácido es menor que en la primera infusión, pero cuando después de la primera infusión de arginina, se administra una dosis de glucosa 27.7 mM la respuesta de insulina a la segunda administración de arginina es aproximadamente 6 veces mayor. Por lo anterior se concluye que la glucosa ejerce un efecto primario en la estimulación de la secreción de insulina por arginina en ratas normales.

En las ratas diabéticas la respuesta secretoria es baja. Aunque la respuesta a glucosa es menor, la respuesta a arginina se conserva; la relación de respuesta a glucosa y a arginina es del 0.01 y 0.29 respectivamente, esta diferencia de relaciones es significativa.

Estudios *in vitro* sugieren que el efecto de la glucosa sobre la estimulación de la secreción por arginina, puede involucrar tanto un incremento en la respuesta ( $V_{max}$ ) como un incremento en la sensibilidad de la célula beta a la arginina.

Se considera que la potenciación hiperglicémica al estímulo de la arginina, es un indicador de la disminución de la capacidad secretoria del páncreas.

Los resultados demuestran que los valores de ED50 para la primera y segunda fase de la secreción de insulina por arginina, son significativamente diferentes uno del otro y que la glucosa incrementa la velocidad máxima de cada fase sin alterar la ED50.

Se ha encontrado que la arginina sola, provoca la secreción de insulina y de glucagon, pero en concentraciones bajas la secreción se reduce en un 59 a 70% de lo que ocurre normalmente aún cuando se acompaña de glucosa, se cree que la arginina en ausencia de glucosa, aumenta el catabolismo endógeno de las dos hormonas como se ha observado en páncreas expuesto a diazóxido y sulfonilureas (24).

La respuesta del páncreas a la arginina, en cuanto a la producción de insulina como se describió anteriormente es bifásica, la primera fase de secreción de la hormona se presenta a los tres minutos después de la administración del aminoácido y la segunda fase se observa alrededor de los treinta minutos después,

como lo demuestran los estudios realizados por Consoli et al (25).

Estudios realizados para medir la concentración de insulina en suero, después de administrar arginina en diferentes concentraciones han informado que para llegar a un máximo de secreción de insulina en la primera fase, se necesita alcanzar una concentración de arginina en suero, de aproximadamente 0.6 mM. La ED50 para la segunda fase de la secreción de insulina por arginina es de  $2.7 \pm 0.4$  mM en el hombre y 5-6 mM en la rata. La marcada diferencia en la ED50 entre la primera y segunda fase de la liberación de insulina implica que la regulación de las dos fases por arginina, puede involucrar diferentes mecanismos.

El hecho de que la glucosa no altere la ED50 para la arginina, puede involucrar un efecto de reabastecimiento de ATP por parte de la glucosa, el cual es máximo a niveles de glucosa de alrededor de 5 mM.

Todo lo anterior nos indica que en el hombre la regulación de las dos fases de secreción de insulina por arginina es diferente, con mayor sensibilidad a arginina para la primera fase que para la segunda. Además de que la hiperglicemia potencializa la secreción de insulina sin alterar significativamente la ED50 de las dos fases de liberación de insulina por arginina (26).

Esta respuesta de insulina a arginina disminuye con la edad y esto al parecer es independiente del secretagogo utilizado, todo esto está relacionado con la edad del individuo, con la reducción de la actividad de la enzima glicerofosfato deshidrogenasa (14,15) y al avance en la producción del estado diabético, como se mencionó anteriormente, aunque no disminuye la producción de glucagon, ni aún en individuos diabéticos (15).

De todas las formas de administración utilizadas (intravenosa, perfusión *in vivo* o *in vitro* y administración intraperitoneal), las que mejores resultados han dado, han sido la técnica de perfusión y la técnica de inyección intravenosa (27).

La arginina no solo causa la liberación de insulina, glucagon y somatostatina en el páncreas, sino que también a grandes concentraciones, puede producir grandes daños en esta glándula, sobre todo a concentraciones mayores a los 500 mg/100 g de peso corporal, los daños que puede causar son: desorganización progresiva y degeneración del retículo endoplásmico rugoso de las células acinares y una reducción en el número de zimógenos y en mitocondrias.

En el estado final del daño pancreático provocado por grandes cantidades de arginina, se observa necrosis de las células acinares con signos de daño celular irreversible como la picnosis y la cariorrhexis (28).

Otro aspecto importante en el metabolismo de la arginina es su relación con la biosíntesis de poliaminas, ya que este aminoácido es hidrolizado por la arginina produciendo L-ornitina y urea.

## **POLIAMINAS**

Las poliaminas son bases alifáticas que presentan dos o más grupos amino, las más estudiadas son la putrescina, espermidina y espermina. Además de éstas, existen otras poliaminas que son menos comunes y que se encuentran en plantas y microorganismos. Algunos aspectos generales sobre su metabolismo y función biológica se describen en las referencias 29 y 30 (ver anexo 1 y 2).

La mayoría de las enzimas que participan en la biosíntesis de estas aminas se localizan en el citosol. En los mamíferos la ornitina descarboxilasa cataliza

el paso inicial en la biosíntesis de poliaminas. Esta enzima transforma la ornitina a putrescina. Otra descarboxilasa, la S-adenosil-L-metionina descarboxilasa y la espermidina y espermina sintasas son también necesarias para la biosíntesis de poliaminas.

La ornitina necesaria para la síntesis de poliaminas se puede formar por acción de la arginasa, de tal manera, que es posible que esta enzima que juega un papel importante en el ciclo de la urea, esté presente en tejidos extrahepáticos para proporcionar la ornitina requerida para la síntesis de poliaminas. Por esta razón se cree que la arginasa puede ser una de las enzimas que regulan la fase inicial de la biosíntesis de poliaminas, además de su bien conocida función en el ciclo de la urea. Esta es una de las razones por las cuales en este trabajo se estudia su actividad en condiciones patológicas experimentales.

La presencia de las poliaminas ha sido descrita prácticamente en todos los sistemas vivos, aunque su concentración puede ser variable, por ejemplo las poliaminas espermidina y espermina se encuentran en bajas concentraciones en las células procariontes, y algunas de estas células carecen de espermina.

Se ha demostrado que las poliaminas se localizan en las células productoras de insulina y que la biosíntesis in vitro de poliaminas es estimulada por la glucosa (31). La glucosa provoca el mayor estímulo para la liberación de insulina, así como para la estimulación de la replicación de los islotes. La síntesis de proteínas en los islotes de Langerhans es estimulada también por la glucosa a concentraciones fisiológicas, a diferencia de otras células.

Se sabe que las poliaminas son importantes para la biosíntesis de proteínas y para la división celular. Además de ser sustratos para las transglutaminasas presentes en las células beta, han sido postuladas como de gran importancia para la liberación de la hormona.

La glucosa estimula la biosíntesis de poliaminas no sólo a partir de ornitina, sino también de la putrescina, por lo tanto es posible que la glucosa afecte la actividad o cantidad tanto de la ornitina descarboxilasa como de enzimas que intervienen en la biosíntesis de poliaminas como la S-adenosilmetionina descarboxilasa, espermidina sintasa o espermina sintasa. No se sabe si la glucosa ejerce un efecto regulatorio de la biosíntesis de poliaminas de una manera directa o indirecta. Pero no se excluye la posibilidad de que las poliaminas o sus derivados puedan ser liberados de los islotes celulares como mensajeros intracelulares o ciberninas (31).

También se ha encontrado que aproximadamente el 5% de la putrescina es transformada a gama-aminobutirato, en las células beta del páncreas y que existe glutamato descarboxilasa, responsable de la producción de gama-aminobutirato.

#### POLIAMINAS Y METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS.

Se ha demostrado que la incubación de adipocitos de rata con insulina, espermidina o espermina, estimula la conversión de glucosa a dióxido de carbono e inhibe la lipólisis, estos efectos han sido observados cuando las concentraciones de las poliaminas varían entre 1-50  $\mu$  (32).

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

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

comportamiento, por lo que se cree que la inhibición de la lipólisis por poliaminas se debe a supresiones en los niveles de AMPc, dicha afirmación se establece ya que la lipólisis inducida con epinefrina o teofilina se inhibe por las poliaminas, sin embargo cuando se administra dibutiril AMPc esta acción no se produce (33).

Las poliaminas intervienen en varios procesos biológicos a nivel de membrana. El grupo de Elgavish demostró que estas moléculas estimulan el transporte de D-glucosa en células ciliadas renales. Dicho transporte quizá se deba a la inhibición de la vía  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  por espermina, estimulando así el mecanismo "simport" de D-glucosa y  $\text{Na}^+$ . En presencia de  $\text{Mg}^{++}$  la espermina permite tener un 10% de la actividad de la Mg-ATPasa esto se debe a la habilidad de esta poliamina para reemplazar al  $\text{Mg}^{++}$  en la síntesis de ATP. El  $\text{Mg}^{++}$  reduce la carga negativa del ATP formando Mg-ATP que después se combina con la ATPasa. Las poliaminas tienen un efecto similar combinándose con el ATP (34).

Se ha demostrado también que algunas enzimas que participan en el metabolismo de los carbohidratos son moduladas por poliaminas (35, 36).

Por medio de estudios de respirometría se ha demostrado que la espermidina y la espermina son capaces de activar la conversión de glucosa a dióxido de carbono, siendo la estimulación esencialmente producida por insulina en células intactas y no así en células lisadas. En este aspecto, las poliaminas se comportan de manera similar a la cisteína, oxitocina y prostaglandinas, las cuales también tienen un efecto similar a la insulina (34).

## INSULINA

### FUNCION

La función principal de la insulina, consiste en controlar el transporte de la glucosa desde el torrente sanguíneo hasta las células, donde es oxidada; se le conoce como una hormona regulada ya que responde al estímulo de la glucosa, pero también afecta el metabolismo de las proteínas y lípidos

### INSULINA Y METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

Uno de los efectos más importantes de la insulina es el de la captación de la glucosa en el hígado para almacenarla en forma de glucógeno, el cual es utilizado en periodos de ayuno para liberar la glucosa al organismo, manteniendo la glucemia.

Los mecanismos que regula la insulina en el metabolismo de carbohidratos, son los siguientes:

a) Inhibición de la glucógeno fosforilasa lo que impide la hidrólisis del glucógeno; la fosforilasa es una enzima que causa la hidrólisis del glucógeno y la consecuente formación de glucosa.

b) Incrementa la actividad de la glucocinasa, lográndose con esto que la captación por las células de la glucosa presente en la sangre aumente; la glucocinasa causa la fosforilación inicial de la glucosa al entrar a la célula lográndose con esto retenerla, ya que la glucosa fosforilada no puede difundir

a través de la membrana plasmática.

c) Aumenta la actividad de la fosfofructocinasa y la glucógeno sintasa, que son enzimas que promueven la síntesis de glucógeno; la primera cataliza la fosforilación de la fructosa-6-fosfato y la segunda se encarga de la polimerización de las unidades de glucosa para sintetizar el glucógeno.

Por medio de estos mecanismos, la concentración de glucógeno en el hígado puede aumentar hasta un 5 a 6% de la masa hepática, la falta de insulina provoca una disminución o anulación de todos los efectos, dando paso a la glucogenólisis, lográndose una degradación del glucógeno almacenado para mantener la glucemia.

La insulina detiene la gluconeogénesis por inhibición de la actividad y cantidad de las enzimas necesarias para ello, parte de este efecto se debe a que la insulina disminuye la liberación de aminoácidos en tejidos extrahepáticos como el músculo, reduciendo la disponibilidad de los precursores necesarios para la gluconeogénesis (37).

La insulina tiene efecto directo en la membrana de la célula muscular facilitando el transporte de la glucosa, ya que se ha observado que la hormona estimula la difusión de glucosa uniéndose a una proteína receptora específica, aumentando de 15 a 20 veces el transporte de glucosa al interior de la célula muscular en reposo, además de que posiblemente modifique la permeabilidad de la membrana a la glucosa ayudando al efecto de absorción.

En cerebro, la insulina no tiene ningún efecto, ya que las neuronas son muy permeables a la glucosa.

#### INSULINA Y METABOLISMO DE LIPIDOS

La insulina al ayudar a la introducción de la glucosa a la célula, provoca varios mecanismos que llevan al depósito de grasas en el tejido adiposo, de los cuales uno es el aumento de la utilización de glucosa por los tejidos del organismo, lográndose con esto "ahorrar grasa"; también la insulina promueve la síntesis de ácidos grasos en las células hepáticas, utilizando glucosa, los ácidos grasos sintetizados son transportados y depositados como grasa en el tejido adiposo.

Los mecanismo por los cuales la hormona aumenta la síntesis de ácidos grasos en el hígado son los siguientes:

a) La insulina incrementa el transporte de glucosa a las células hepáticas, para la síntesis de glucógeno en la célula, al aumentar de un 5 a 6% la concentración de éste en el hígado, se inhibe por sí misma la síntesis del glucógeno, por lo que toda la glucosa restante es utilizada para la formación de grasa, transformándose por la vía glucolítica en piruvato, y este a su vez en acetil-CoA del cual se sintetizan ácidos grasos.

b) Cuando se utilizan cantidades elevadas de glucosa para energía, se forma un exceso de iones isocitrato por el ciclo de los ácidos tricarbónicos, que tienen efecto directo en la activación de la acetil-CoA carboxilasa, necesaria para iniciar la primera etapa de la síntesis de ácidos grasos, que serán utilizados dentro del propio hígado para sintetizar los triacilglicéridos necesarios para la formación de las lipoproteínas y que son la forma común de almacenamiento de grasa.

La insulina tiene en gran parte el mismo efecto en las células adiposas que en las hepáticas para la síntesis de ácidos grasos, aunque la cantidad de ácidos grasos sintetizados es muy baja, ya que para este proceso sólo se utiliza la décima parte de la glucosa que se transporta al hígado.

c) La insulina activa a la lipasa de las lipoproteínas del tejido adiposo, que

desdobla de nuevo a los triacilglicéridos, convirtiéndolos en ácidos grasos, este fenómeno es indispensable para que las células adiposas absorban a los ácidos grasos y los puedan almacenar de nuevo en forma de triacilglicéridos.

Otros dos efectos que tiene la insulina para el almacenamiento de grasas en las células adiposas son:

- La insulina inhibe la acción de la lipasa hormonosensible, enzima que causa la hidrólisis de los triacilglicéridos en las células adiposas, inhibiéndose por lo tanto la liberación de ácidos grasos a la sangre.
- La insulina promueve el transporte de glucosa al interior de las células adiposas de la misma forma que en las células musculares. Parte de esta glucosa se utiliza para la síntesis de ácidos grasos.

Durante el desdoblamiento glucolítico para realizar este proceso se forman grandes cantidades de alfa glicerofosfato, que proporciona el glicerol que se une a los ácidos grasos para formar triacilglicéridos que se depositan en la células adiposas.

De acuerdo con lo anterior, cuando no se dispone de insulina para promover la entrada de glucosa a las células adiposas, se inhibe o bloquea en forma considerable el depósito de grasas.

#### INSULINA, METABOLISMO DE PROTEINAS Y CRECIMIENTO

Cuando se disponen de cantidades excesivas de nutrientes en la sangre circulante, como por ejemplo después de una comida, además de los carbohidratos y grasas en los tejidos también se almacenan proteínas, acción sobre la cual la insulina juega un papel muy importante. Los mecanismos que se han descubierto, por los cuales la insulina ayuda al metabolismo de las proteínas son los siguientes:

- a) La insulina causa el transporte activo de varios aminoácidos al interior de la célula, entre los que se encuentran la valina, leucina, isoleucina, tirosina y fenilalanina. En consecuencia, la insulina comparte con la hormona del crecimiento la capacidad de aumentar la captación de aminoácidos por las células.
- b) La insulina actúa en la síntesis de proteínas incrementando el aporte de energía para dicha síntesis, además de que tiene efecto directo en los ribosomas, ya que se ha encontrado que la insulina ayuda a aumentar el número de éstos en la síntesis de proteínas y facilita la unión de los ribosomas al mRNA aumentando la eficiencia de la traducción.
- c) Durante un período prolongado la insulina también aumenta la transcripción del DNA en los núcleos celulares, formando así mayores cantidades de RNA. Incrementa la síntesis de novo de DNA e incluso la reproducción de la célula. Todos estos efectos, promueven aún más la síntesis de proteínas.
- d) La insulina también inhibe el catabolismo de las proteínas y por lo tanto la liberación de aminoácidos de las células, sobre todo de aminoácidos glucogénicos. Posiblemente este hecho depende de cierta capacidad de la insulina para disminuir la degradación normal de proteínas por los lisosomas.

La mayoría de los aminoácidos gluconeogénicos liberados de la destrucción de las proteínas, como resultado de una insuficiencia de insulina y una diabetes no controlada, entran a la ruta de la gluconeogénesis vía piruvato, el piruvato es transformado a fosfoenolpiruvato por la acción secuencial de las enzimas piruvato carboxilasa (PC) y fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK), que son dos enzimas claves en la regulación de la gluconeogénesis. Las actividades de estas dos enzimas se incrementan en la diabetes. Se ha demostrado que la insulina reduce la actividad de estas enzimas en el hígado, pero solo en un 10% (37).

La deficiencia de insulina no produce una elevación en la actividad de estas enzimas, pero se sabe que los glucocorticoides inducen grandes incrementos en la actividad de la PEPCK.

En un estado diabético hay un catabolismo aumentado de proteínas y síntesis disminuida de éstas, y una actividad incrementada de la glucosa-6-fosfatasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa.

Estudios realizados con glicerol marcado indican que la insulina favorece la síntesis de proteínas más que de glucosa a partir de esta molécula. La ruta PC-PEPCK no participa en la transferencia del carbono marcado del glicerol en la ruta de la gluconeogénesis ni en la ruta de la biosíntesis de proteínas.

Lo anterior nos prueba que la insulina controla la gluconeogénesis estimulando la síntesis de proteínas.

El efecto inmediato de la insulina en el bloqueo de la gluconeogénesis es el de dirigir el flujo de sustrato, como lo son los aminoácidos glucogénicos, a través de la síntesis de proteínas y no al de bloquear la actividad de la PC y la PEPCK.

En el hígado la insulina deprime la gluconeogénesis al disminuir la actividad de las enzimas que la promueven, como la PC y la PEPCK, pero sólo lo hace en aproximadamente un 10%, como se mencionó anteriormente. Como los sustratos utilizados para la síntesis de glucosa por la gluconeogénesis, son los aminoácidos plasmáticos, esta supresión de la gluconeogénesis conserva a los aminoácidos en las reservas de proteínas del cuerpo.

Por lo tanto la insulina favorece la formación de proteínas e inhibe su degradación, lo cual contribuye al crecimiento del organismo; al parecer la hormona del crecimiento y la insulina funcionan de manera sinérgica para promover esto, realizando cada una su función específica por separado.

#### BIOSINTESIS

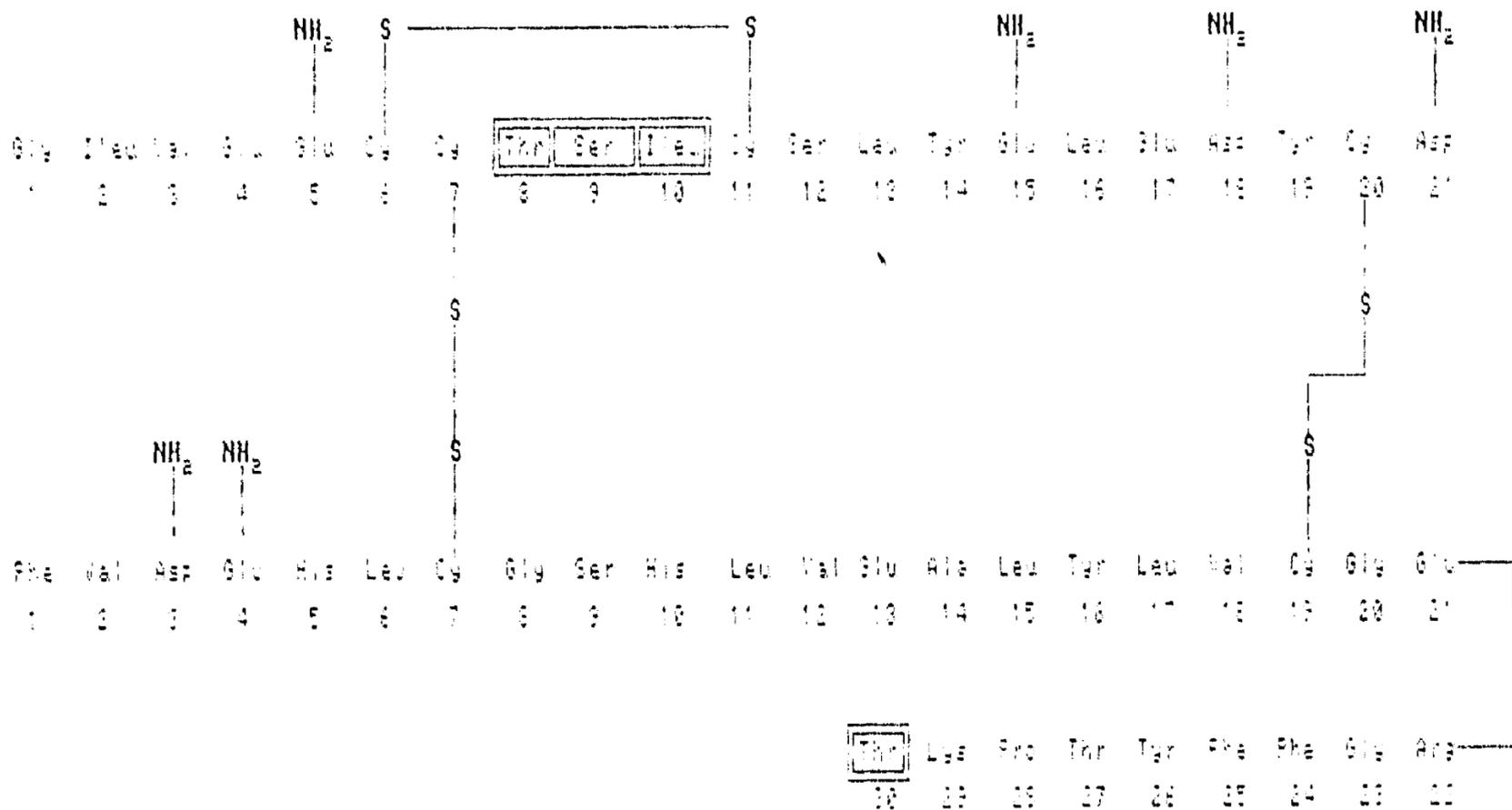
La insulina es una proteína compuesta por dos cadenas de aminoácidos llamadas A y B (figura 5), conectadas entre sí por puentes disulfuro, con estructura terciaria y cuya ruptura provoca que se pierda la actividad funcional de esta hormona.

La insulina, es producida por las células beta de los islotes de Langerhans a partir de la preproinsulina, por un mecanismo de síntesis de proteínas ordinario, el cual comienza en el núcleo, con la activación de un gen presente en el DNA, que determina la composición de la preproinsulina, transcribiéndose en la banda de otro ácido nucleico, el RNA que origina y procesa a su vez el mRNA que se exporta al citoplasma celular, sirviendo como molde para la síntesis de la proteína en los ribosomas (1).

Al ser sintetizada la preproinsulina en esta zona, la proteína pasa desde el ribosoma, a través de la membrana del RER. La preproinsulina, tiene un fuerte carácter hidrofóbico dado por las extensiones N-terminales las cuales se piensa promueven la asociación de los ribosomas con la membrana del retículo endoplásmico, lo que lleva a una descarga vectorial a través de la membrana dentro del espacio de la cisterna del retículo endoplásmico (1).

En cuanto esta alcanza el lumen o porción interior del RER (figura 6), la proinsulina es degradada por proteasas sintetizadas también por los ribosomas, quedando proinsulina, como lo demuestran estudios realizados por métodos autoradiográficos, ya que se ha encontrado que transcurridos 5 minutos después del marcaje con aminoácidos radiactivos, la mayoría de las moléculas radiactivas se encuentran en el RER; por cromatografía se puede observar que la molécula

predominante es la proinsulina, esto indica que la preproinsulina se hidroliza apenas se ha formado, dando lugar a la proinsulina.



	Cadena B			Cadena A
	1	8	10	10
Humano	Thr	Ser	Ileu	Thr
Ovino	Thr	Ser	Ileu	Ala
Conejo	Thr	Ser	Ileu	Ser
Bovino	Ala	Ser	Val	Ala

Figura 5. Secuencia de insulina humana y su diferencia con algunas especies animales.

La hidrólisis enzimática de la preproinsulina deja en el interior del RER a la proinsulina, que es una molécula que agrupa las cadenas de aminoácidos de la insulina A y B, y un péptido de unión llamado péptido C, que engarza el final de una cadena con el principio de la otra, este péptido se separa de la molécula original formándose así la insulina.

La proinsulina sufre en el interior del retículo endoplásmico un proceso de acomodamiento y oxidación de grupos sulfhidrilo de las cisteínas presentes en las posiciones 7 y 19 de la cadena B, y los sitios 72 y 85 de la cadena A de la molécula de proinsulina, para formar puentes disulfuro que proporcionan la actividad y conformación característica de la molécula de insulina.

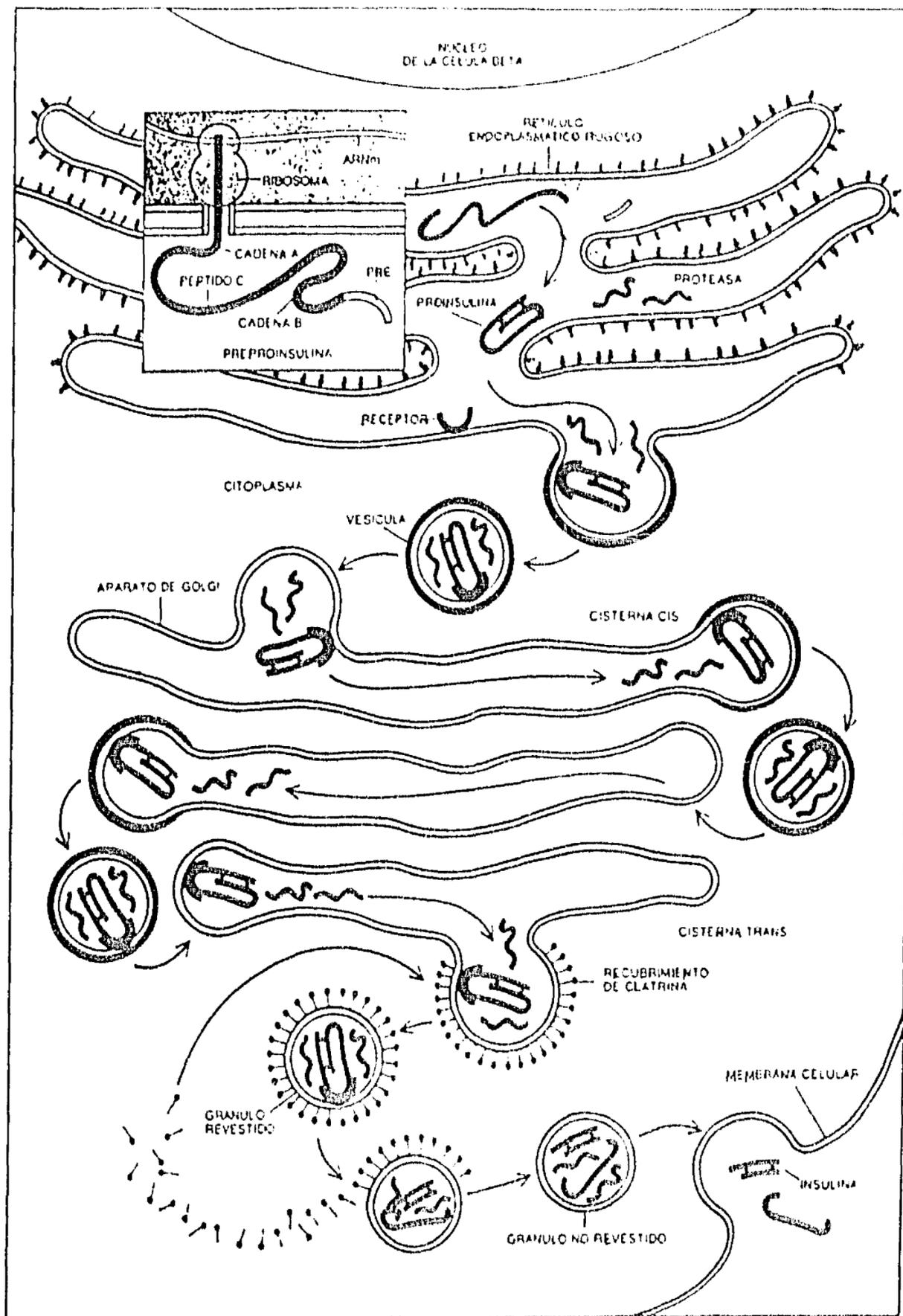


Figura 6. Biosíntesis de la Insulina.

Al realizarse estas fases en la síntesis de la insulina se induce un flujo uniforme de pequeñas vesículas procedentes del retículo endoplásmico, portadoras de proteína hacia los sáculos del aparato de Golgi en un proceso que requiere de aproximadamente 20 minutos.

El aparato de Golgi presenta dos tipos de gránulos: los gránulos de secreción recubiertos que tienen una capa de filamentos que recubre su membrana externa, los cuales están formados de una proteína llamada "clatrina", que está relacionada con movimientos de la membrana sobre todo con la gemación de fragmentos de la misma. El segundo tipo de gránulos, que son los más abundantes y se encuentran dispersos por todo el citoplasma de la célula beta, son los gránulos "no recubiertos", llamados así porque no presentan la capa de clatrina y provienen de los gránulos cubiertos, estos gránulos dan lugar a los llamados gránulos beta.

Cuando llegan las vesículas del RER a los sáculos del aparato de Golgi, éstas se fusionan con la membrana del sáculo que está más próximo al RER (este lado del sáculo se le llama cara cis o cisterna cis), la transferencia proteínica de una cisterna del aparato de Golgi a la siguiente se realiza por medio de microvesículas, similares a las que transportan las proteínas del RER al polo cis de los sáculos del aparato de Golgi.

Las microvesículas surgen por gemación del extremo de una cisterna, viajan a la siguiente y se fusionan con ella, este proceso se repite hasta que se alcanza el polo trans, donde las cisternas emiten una yemas o extremidades dilatadas que llevan filamentos de clatrina y en las cuales llega a apreciarse un contenido denso de proteínas; estas invaginaciones dan lugar a los gránulos de secreción recubiertos.

Por medio de mediciones con autoradiografía y técnicas de microscopía electrónica se ha descubierto que la transformación de proinsulina en insulina se realiza específicamente en los gránulos de secreción recubiertos del aparato de Golgi (3). La transformación de proinsulina a insulina se comporta como una reacción de primer orden y se lleva aproximadamente en una hora por un tipo de tripsina y por una carboxipeptidasa la cual es necesaria para remover los residuos C-terminales resultantes de la ruptura por la tripsina (2).

La proinsulina se une a unos receptores presentes en la cara interna de la membrana del aparato de Golgi, los cuales transportan a la hormona hasta las cisternas del polo trans. Almacenada ahí la proinsulina, el extremo dilatado de la cisterna se estrangula hasta convertirse en un gránulo de secreción recubierto.

Se ha descubierto en los gránulos de secreción de la hipófisis: hormona adrenocorticotrófica e insulina, esto indica que, además de las células beta, hay otras células equipadas también con receptores que agrupan las proteínas en los gránulos secretoras, lo que sugiere que un receptor puede reconocer varias proteínas reguladoras.

La producción de insulina a partir de proinsulina en los gránulos recubiertos requiere de la separación del péptido de unión o péptido C. En consecuencia por cada molécula de insulina que se sintetiza se genera otra molécula de péptido C, transportado con aquella en los gránulos de secreción recubiertos, a través de los sáculos de Golgi.

Se ha reportado la existencia de un gradiente de acidificación progresiva entre los gránulos recubiertos y los gránulos sin recubrir, el cual se halla en relación inversa con la cantidad de insulina presente en dichos gránulos. Lo que sugiere que la acidificación del interior de los gránulos recubiertos es un factor importante en la activación de las proteasas. Cierta número de moléculas alcalinas como el cloruro de amonio, que se acumulan en los gránulos y

neutralizan el pH ácido inhiben la ruptura de la proinsulina.

Junto con el péptido C y con una pequeña cantidad de proinsulina sin hidrolizar la insulina se almacenan en gránulos sin recubrir y maduros, dispuesta para su secreción en respuesta a un estímulo apropiado. En la ruta hacia la membrana celular donde se produce la secreción, algunos gránulos se fusionan con lisosomas, que podrían considerarse los "basureros celulares". Esto conlleva la total degradación de la insulina en estos gránulos.

Conforme el gránulo secretor llega al límite celular, la membrana del sáculo se fusiona con la membrana celular, rodeada de capilares que llegan al torrente sanguíneo, en estos capilares se secreta la insulina liberándola a la sangre, a este proceso se le llama amiocitosis (3).

Esta hormona es liberada al torrente sanguíneo como respuesta a un aumento en la glucemia, la liberación de la hormona se acompaña de una liberación Zn, cuya función es la de formar complejo con las moléculas de insulina produciendo un hexámero osmóticamente inactivo y una forma cristalina bioquímicamente estable (2); para iniciar sus efectos sobre las células blanco, la insulina se fija en proteínas receptoras de la membrana, activando al receptor que inicia los efectos de la insulina (los mecanismos de este efecto aún son desconocidos). Pero lo que si se sabe es que los receptores activados excitan al sistema del AMP cíclico, el cual se piensa es un segundo mensajero para promover algunos de los efectos de la insulina (1).

## OBJETIVOS

Con base en los antecedentes descritos se planteó:

1. Estudiar el efecto de L-arginina sobre la actividad de arginasa pancreática y los niveles de poliaminas en ratas diabéticas, y
2. Estudiar, también en la rata diabética, la acción de la L-arginina y de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina sobre la función pancreática.
3. Comparar los efectos de L-arginina y de las poliaminas con la acción de insulina sobre la función pancreática

Para evaluar estas acciones se realizaron varias determinaciones bioquímicas tanto en suero como en tejido y los resultados que se obtuvieron de los estudios en animales diabéticos se compararon con aquellos obtenidos de ratas normales.

## TRABAJO EXPERIMENTAL

### PRIMERA PARTE.-

**Material y métodos.** Para el desarrollo de la primera parte se formaron cuatro grupos de diez ratas macho adultos de la cepa Long-Evans, con un peso de 290-330 g. Los animales que habían sido alimentados a libertad se mantuvieron en ayuno 18 h y se agruparon de la siguiente manera: El Grupo I sirvió como control y se le administró 1.0 ml de solución salina 0.154 M (i.p.). Grupo II. A las ratas de este grupo se les inyectaron 120 mg de aloxana / kg (i.v.) en 1.0 ml de NaCl

0.154 M y se usó como grupo control diabético. Grupo III. A los animales intactos se les inyectó L-arginina 10 mM (Merck) en 1.0 ml de NaCl 0.154 M (i.p.). Grupo IV. A las ratas se les indujo diabetes como en el grupo II. Después de 96 h se trataron con L-arginina 10 mM en 1.0 ml de NaCl 0.154 M.

Las ratas se anestesiaron con 50 mg de Ketamina / kg, (i.m.) y se sacrificaron 20 min. después de cada tratamiento. Se tomó una muestra de sangre de la aorta para la determinación de glucosa, la cual se realizó utilizando un equipo de reactivos para determinación enzimática de Boehringer (Mannheim, F.R.G.).

Los tejidos pancreáticos se disecaron y limpiaron de tejido adiposo, se enjuagaron en solución salina fría, se secaron y pesaron;  $1.272 \pm 0.20$  g (promedio  $\pm$  D.E.). Se preparó un homogeneizado del tejido pancreático al 20% (P/V) en NaCl 0.154 M para las determinaciones del peso seco y poliaminas. Para la determinación de la actividad de arginasa se utilizó un amortiguador de Tris-HCl 0.04 M pH 8.7 conteniendo MnCl<sub>2</sub> 0.2 mM.

El procedimiento para la determinación de peso seco fue como sigue: a 10  $\mu$ l del homogeneizado preparado en NaCl 0.154 M se le agregaron 990  $\mu$ l de agua destilada y después 1.0 ml de solución de dicromato de potasio al 2% recién preparada en ácido sulfúrico concentrado. La reacción se llevó a cabo espontáneamente, los tubos se enfriaron y la absorbancia se registró después de 10 min. utilizando un espectrofotómetro DU-64 (Beckman). Para esta determinación se utilizó una solución estándar de manosa de 2 mg/ml (38).

Las poliaminas se extrajeron y formaron sus derivados como sigue: 1 ml del homogeneizado en solución salina se mezcló inmediatamente con ácido perclórico a una concentración final de 0.2 M y se procesó de acuerdo al método de Hougaard et al (39).

El material residual se recuperó con HCl 0.05 N. se evaporaron 10  $\mu$ l de la solución concentrada y las poliaminas se dabsilaron siguiendo las especificaciones dadas para el uso del equipo de dabsilación (non-hydrolysis set de Beckman, Cat. No. 240390). Se utilizaron soluciones estándares de putrescina, espermidina y espermina (sigma).

Las poliaminas se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo al método descrito por Lamster et al. (40), con ligeras modificaciones que consistieron básicamente en la separación cromatográfica, la cual se realizó por medio de una columna de compresión radial C18 10 $\mu$  Li Chrosob (8 mm x 10cm) de Merck (Cat. No. 50334). La detección de las poliaminas dabsiladas se hizo con un detector de absorbancia Waters 484. Se determinaron las áreas bajo las curvas utilizando un integrador de Hewlett Packard (Paramus, NJ, USA).

La actividad de arginasa se evaluó a través de la formación de urea por el método de Kung et al. (41). Las proteínas totales se determinaron en el homogeneizado por el método de Lowry et al (42).

Los datos se analizaron por medio de la prueba estadística de Fisher

### RESULTADOS

Después de 96 h de la inducción de la diabetes el peso de las ratas disminuyó considerablemente con respecto a su peso inicial ( $304.44 \pm 9.09$  a  $269.3 \pm 14.60$  promedio  $\pm$  D.E.),  $P < 0.05$ . El estado diabético se evaluó midiendo la concentración de glucosa en una muestra de sangre tomada de la aorta (Tabla IX).

La concentración de poliaminas se expresa como n moles/mg de proteína en el tejido pancreático de los cuatro grupos estudiados (Tabla X).

TABLA IX. PROMEDIO  $\pm$  D.E. DE LOS VALORES DE GLUCOSA EN SUERO, ACTIVIDAD DE ARGINASA Y DE OTROS PARAMETROS MEDIDOS EN EL PANCREAS

	Control		Tratamiento con L-arginina	
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Glucosa (mg/dl)	163.05 $\pm$ 43.66	246.22 $\pm$ 67.21*	181.79 $\pm$ 36.01	290.23 $\pm$ 98.68*
Urea basal (pmoles/mg de protefna)	ND	ND	16.12 $\pm$ 6.82*	10.06 $\pm$ 3.50*
Arginasa (nmoles urea/mg de protefna/min)	78.47 $\pm$ 16.09	65.46 $\pm$ 16.49	149.52 $\pm$ 29.95*	89.27 $\pm$ 37.63
Protefna Peso seco	0.42 $\pm$ 0.14	0.42 $\pm$ 0.15	0.46 $\pm$ 0.13	0.71 $\pm$ 0.09

Los valores corresponden a 10 determinaciones.

N.D. = no detectable.

\* Los valores son diferentes (P < 0.005) comparados con el grupo control.

*La formación de derivados dabsilados permitió detectar bien a las poliaminas. En general la concentración de las tres poliaminas disminuyó después de la inyección de aloxana (grupo II). Sin embargo, la concentración de putrescina se incrementó en respuesta a la administración de L-arginina, tanto en el grupo control (grupo III) como en el que se le indujo diabetes (grupo IV), comparados con sus respectivos controles (grupos I y II). En el caso de la espermidina y de la espermina, no se observó la misma respuesta, las concentraciones no se recuperaron con arginina y tendieron a ser más bajas que aquellas de las ratas control.*

TABLA X. CONCENTRACION DE POLIAMINAS EN EL TEJIDO PANCREATICO

Poliamina	Antes de administrar L-arginina		Después de administrar L-arginina 10 mM	
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Putrescina	1.23 $\pm$ 0.35	1.11 $\pm$ 0.90	1.84 $\pm$ 0.33	1.25 $\pm$ 0.52
Espermidina	1.31 $\pm$ 0.45	0.44 $\pm$ 0.43*	0.68 $\pm$ 0.23	0.05 $\pm$ 0.03*
Espermina	0.09 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.008

Los valores están expresados como nmoles/mg de protefna y representan el promedio  $\pm$  la D.E. de 10 determinaciones.

\* Los valores son diferentes (P < 0.10) comparados con el grupo control.

La actividad de arginasa disminuyó con la administración de aloxana (grupo II) pero fue marcadamente estimulada por L-arginina en el grupo con diabetes inducida (IV), aunque este valor no alcanzó los valores obtenidos para el grupo control tratado con L-arginina (III). La actividad de arginasa mostró un patrón similar al observado para putrescina (Tabla X). Las concentraciones de urea basal coincidieron con la actividad de la arginasa en el tejido pancreático de ratas no tratadas y tratadas con L-arginina (Tabla IX). La relación peso seco/proteína fue más alta para ambos grupos III y IV comparados con sus respectivos controles (I y II).

#### DISCUSION

Los resultados obtenidos de este estudio indican que la concentración de poliaminas en el páncreas de las ratas tratadas con aloxana disminuye (Tabla X). Esta disminución se acompaña de una pérdida de la actividad de arginasa tisular (Tabla IX).

La L-arginina exógena rápidamente recuperó no solamente la actividad de arginasa el tejido de los animales diabéticos e incrementó la actividad en el tejido normal, sino que también recuperó la concentración de putrescina en el tejido pancreático dañado. Estos efectos no se observaron para espermidina o espermina (n=10).

El incremento en la actividad de arginasa puede ser visto por las concentraciones de urea basal en tejidos expuestos a este aminoácido (Tabla IX). Estos resultados concuerdan con las observaciones de Mallaisse et al. (43), en islotes recién obtenidos. Ellos encontraron que después de incubar 90 min. ni la glucosa, ni la L-arginina o la L-ornitina afectan el contenido de aminos de los islotes. Nosotros observamos una tendencia similar hacia un incremento en el contenido de putrescina en presencia de L-arginina y bajas concentraciones para las otras poliaminas, después de 20 min. de la administración de L-arginina 10 mM.

La administración de L-arginina produjo un incremento en la concentración de glucosa sanguínea en las ratas del grupo control y las ratas tratadas con aloxana estudiadas a los 20 minutos. Esto puede ser debido en parte a las propiedades gluconeogénicas de la L-arginina y que ha sido reportado por varios autores que ocurre en animales (44) y en humanos (45-47).

Ya que el páncreas, a diferencia del hígado, carece de otras enzimas del ciclo de la urea, la participación de la arginasa en la biosíntesis de putrescina, parece particularmente atractiva ya que la concentración de esta amina se incrementa en el tejido estudiado, de manera similar a como lo hace la actividad de la ornitina descarboxilasa a partir de la ornitina en islotes aislados (43).

Parece que la arginasa puede tener una función importante en la síntesis de proteínas pancreáticas. En estos experimentos se observó una alta relación proteína/peso seco para los grupos tratados con L-arginina (III y IV). Estos resultados pueden sugerir la participación de la arginasa en la biosíntesis de proteínas mediada por la putrescina o espermidina y espermina, tal interacción puede representar parte del mecanismo para la regulación de la biosíntesis de la insulina y la secreción observada previamente (39, 48). En este trabajo no se estudió la incorporación de las poliaminas, espermidina o espermina in vivo en las proteínas pancreáticas por transglutaminasas, pero se ha reportado que esto ocurre en islotes aislados (43). Al respecto, se ha demostrado que la putrescina y la espermidina son necesarias para la biosíntesis de insulina y proteínas in vitro, y que la supresión de espermina afecta a varios procesos involucrados en el metabolismo de insulina (48).

Estos resultados proporcionan información acerca del metabolismo de la L-arginina

en el páncreas *in vivo* y su posible participación como secretagogo de la insulina. La regulación de la insulina y otras hormonas pancreáticas por L-arginina ha sido ampliamente estudiado (49-51). Es posible que la arginasa, que juega un papel importante en el ciclo de la urea, esté presente en el páncreas para proporcionar la ornitina requerida para la síntesis de poliaminas, además de su participación en otras vías metabólicas (43). Por esta razón se cree que la arginasa puede ser una de las enzimas que regula la fase inicial de la biosíntesis de poliaminas en el páncreas.

En el anexo 3, referencia 52 se presenta la publicación de esta información. La metodología utilizada se incluye en un apéndice de técnicas en la parte final de este trabajo.

#### SEGUNDA PARTE.-

**Material y métodos.** Para estudiar la acción de las poliaminas sobre la función pancreática, se formaron siete grupos de siete ratas cada uno, con características similares a las utilizadas en la primera parte. Estas ratas se mantuvieron en ayuno por 24 horas y se agruparon como sigue: I-Control-NaCl 0.154 M. II-Diabéticas-NaCl 0.154 M (96 horas después de la administración de aloxana, 120 mg/kg i.v.). III-Diabéticas 96 horas tratadas con insulina (1.5 unidades/kg) cada 24 horas y dos horas antes del sacrificio. IV-diabéticas 96 horas tratadas con L-arginina 10 mM 2 horas antes del sacrificio. Los grupos del V al VII estuvieron formados de ratas diabéticas de 96 horas a las que se les administraron putrescina, espermidina y espermina respectivamente, a una concentración de 5 mg/kg i.p., 2 horas antes del sacrificio. Todas las ratas se sacrificaron previa anestesia y se les tomó muestra de sangre para la determinación de glucosa, triacilglicéridos, alfa amilasa, proteínas y actividad de arginasa. El tejido pancreático se disecó y procesó como se describe en la primera parte y se utilizó para la determinación de proteínas totales, arginasa, DNA (53) y peso seco.

#### RESULTADOS

Los valores de glucosa, triacilglicéridos y alfa amilasa del suero de ratas normales y diabéticas se presentan en la Tabla XI. La actividad de arginasa y

TABLA XI. ALGUNAS DETERMINACIONES CLINICAS REALIZADAS EN EL SUERO DE RATAS DIABETICAS TRATADAS CON INSULINA, L-ARGININA Y POLIAMINAS

	Control (I)	Diabético (II)	Insulina (III)	L-arginina (IV)	Putrescina (V)	Espermidina (VI)	Espermina (VII)
Glucosa (mg/dl) (n=7)	135.41 ± 10.0	363.87 <sup>a</sup> ± 52.03	76.87 <sup>a,b</sup> ± 11.28	458.63 <sup>a,b</sup> ± 15.73	199.83 <sup>a</sup> ± 29.63	465.47 <sup>a,b,c,d</sup> ± 113.86	443.14 <sup>a,b,c,d</sup> ± 8.58
Triacilglicéridos (mg/dl) (n=7)	47.18 ± 5.53	70.83 <sup>a</sup> ± 21.46	57.81 ± 19.09	73.19 <sup>a</sup> ± 13.19	34.91 <sup>b</sup> ± 6.21	53.24 <sup>b,c</sup> ± 23.57	44.41 <sup>b</sup> ± 3.72
α-amilasa (U/l) (n=7)	931.97 ± 97.46	865.71 ± 168.94	1191.41 <sup>a,b</sup> ± 144.38	927.24 ± 356.80	1646.71 <sup>a,b</sup> ± 411.47	1373.95 <sup>a,b,c</sup> ± 306.125	558.64 <sup>a,b,c</sup> ± 107.26

Los valores son el promedio ± la desviación estandar.

( ) = número de determinaciones.

Hay diferencias significativas (P < 0.005) cuando se comparan: <sup>a</sup> los grupos II al VII con el grupo I, <sup>b</sup> los grupos III al VII con el grupo II, <sup>c</sup> los grupos V, VI y VII con el grupo IV, <sup>d</sup> los grupos VI y VII con el grupo V.

la concentración de proteínas en el suero se presentan en la Tabla XII. Los valores de la actividad de arginasa y de las relaciones de mg de proteína/mg de peso seco, así como mg de DNA/mg proteína del tejido pancreático se presentan en la Tabla XIII.

TABLA XII. VALORES PARA PROTEINAS Y ACTIVIDAD DE ARGINASA EN EL SUERO DE RATAS NORMALES Y DIABETICAS TRATADAS CON INSULINA, L-ARGININA Y POLIAMINAS

	Control (I)	Diabético (II)	Insulina (III)	L-arginina (IV)	Putrescina (V)	Espermidina (VI)	Espermina (VII)
Proteínas g % (n = 7)	8.20 ± 0.34	8.65 ± 0.85	8.52 ± 0.52	9.05 <sup>a</sup> ± 0.37	7.77 ± 0.26	8.64 <sup>a</sup> ± 0.23	7.63 ± 0.66
Arginasa nmoles de urea/ mg prot/min (n = 7)	11.46 ± 0.29	5.19 <sup>a</sup> ± 1.32	19.38 <sup>a,b</sup> ± 5.51	6.47 <sup>a</sup> ± 1.93	4.95 <sup>a</sup> ± 1.51	3.19 <sup>a</sup> ± 0.91	4.54 <sup>a</sup> ± 0.49

( ) = número de determinaciones.  
Los valores son el promedio ± la desviación estándar.  
Hay diferencias significativas (P < 0.005) cuando se comparan: <sup>a</sup> los grupos II al VII con el grupo I, <sup>b</sup> los grupos III al VII con el grupo II.

### DISCUSION

Los valores de glucosa que se presentan en la Tabla XI evidencian la presencia de daño pancreático causado por la aloxana, el ayuno prolongado permite tener mayores diferencias entre los valores de glucemia del grupo I-control y el grupo tratado con aloxana (135.41 ± 10 y 363.87 ± 52.03 mg/dl, respectivamente), produciéndose un incremento de 2.69 veces en el nivel de glucosa sanguínea. Cuando a las ratas diabéticas se les administró insulina (NPH de 100 U) los niveles de glucosa disminuyeron como era de esperarse (grupo III), sin embargo, los valores obtenidos son bajos, posiblemente esto se deba a que la última administración se hizo 2 horas antes del sacrificio. La acción de este tipo de insulina se presenta de 6 a 12 horas después de ser administrada, pero se ha demostrado que su acción comienza a partir de las 2 horas de inyección. Este grupo (III) se utilizó como control para evaluar la acción de arginina y las diferentes poliaminas en los otros grupos.

Cabe señalar que tanto la arginina como las poliaminas putrescina, espermidina y espermina, aumentan significativamente, el valor de glucosa con respecto al grupo control y al grupo diabético, excepto para putrescina, cuya diferencia no es significativa e inclusive disminuye los valores con respecto al grupo control diabético (II). Este efecto lo observamos para arginina en el estudio previo y también ha sido reportado por otros autores, posiblemente esté relacionado con sus propiedades gluconeogénicas.

Los efectos de espermidina y espermina no son fáciles de explicar, pero estas moléculas siguen un comportamiento diferente y parecen actuar a través de transglutaminasas, induciendo síntesis de proteínas, como ha sido reportado por otros autores (43). Las tres poliaminas disminuyen significativamente el nivel

de triacilglicéridos con respecto al grupo diabético lo que concuerda con observaciones previas, hechas en adipocitos de rata (33), donde se reporta un efecto de supresión de la lipólisis. Con relación a la alfa amilasa, este parámetro se midió para evaluar si el daño ocasionado por aloxana era únicamente endocrino. A pesar de no haber evaluado el daño histológicamente una disminución en la actividad de alfa amilasa como la determinada en estos experimentos indica un posible desequilibrio en la función exócrina. Este efecto se revirtió con arginina, putrescina y espermidina en forma similar a la insulina, pero no así con la espermina, que inclusive provocó una disminución significativa con relación a los correspondientes controles (Tabla XI).

Por otra parte, se observaron incrementos significativos en la concentración de proteínas en el suero de las ratas tratadas con arginina y espermidina en relación al grupo control (Tabla XII) estos resultados pueden ser explicados en función de las diferentes vías metabólicas que sigue la arginina (figura 2). La participación de la espermidina en la síntesis de proteínas puede ser vía transglutaminasas como se describió previamente.

Las relaciones de mg de prot./mg de peso seco fueron mayores en los animales a los que se administró arginina y poliaminas, estos datos concuerdan con lo anterior, particularmente, con lo que se observó para arginina y espermidina (Tabla XIII).

TABLA XIII. VALORES DE LA ACTIVIDAD DE ARGINASA Y DE LAS RELACIONES PROTEINA-PESO SECO Y DNA - PROTEINA EN EL TEJIDO PANCREATICO DE RATAS NORMALES Y DIABETICAS TRATADAS CON INSULINA, L-ARGININA Y POLIAMINAS

	Control (I)	Diabético (II)	Insulina (III)	L-arginina (IV)	Putrescina (V)	Espermidina (VI)	Espermina (VII)
Arginasa nmoles urea/mg prot/min (n = 7)	76.54 ± 13.18	66.01 ± 19.10	274.44 <sup>a,b</sup> ± 32.14	137.33 <sup>a,b</sup> ± 47.80	121.73 <sup>a,b</sup> ± 35.61	133.41 <sup>a,b</sup> ± 47.80	129.00 <sup>a,b</sup> ± 16.03
(mg prot/mg Peso Seco) (n = 7)	0.45 ± 0.05	0.51 ± 0.08	0.50 ± 0.07	0.69 <sup>a,b</sup> ± 0.11	0.75 <sup>a,b</sup> ± 0.06	0.79 <sup>a,b,c</sup> ± 0.14	0.79 <sup>a,b</sup> ± 0.06
mgDNA/mg prot. (n = 6)	0.040 ± 0.013	0.088 <sup>a</sup> ± 0.005	0.057 ± 0.013	0.040 ± 0.018	0.050 ± 0.007	0.080 <sup>a</sup> ± 0.040	0.056 ± 0.005

( ) = número de determinaciones.

Los valores son el promedio ± la desviación estándar.

Hay diferencias significativas (P < 0.005) cuando se comparan: <sup>a</sup> los grupos II al VII con el grupo I, <sup>b</sup> los grupos III al VII con el grupo II, <sup>c</sup> los grupos V, VI y VII con el grupo IV.

Con relación al DNA, hay un incremento en la relación mg de DNA/mg de proteína en presencia de espermidina, que concuerda con el incremento que se observa en la concentración de proteínas en presencia de esta poliamina, sin embargo, el valor que se obtiene para el grupo control diabético, podría especularse que se deba a ruptura celular causada por efecto de aloxana.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

La actividad de arginasa en el suero disminuyó considerablemente en el grupo de ratas diabéticas, se recuperó con insulina, y moderadamente con la arginina. De las poliaminas estudiadas, la putrescina es la que muestra mayor efecto, pero este no llega a dar valores significativos (Tabla XII).

La actividad de arginasa en el tejido pancreático dañado fue baja con respecto al control (Tabla XIII), lo que concuerda con los datos obtenidos previamente. La actividad de esta enzima se incrementa marcadamente ( $P < 0.005$ ) con insulina, arginina y con las poliaminas. El efecto que muestran estas moléculas es similar entre ellas, no existe diferencia significativa en sus acciones y aunque los valores que se obtienen son menores a los de insulina, el efecto es parecido.

La activación de la arginasa que se observa con la administración de arginina puede ser una explicación parcial del efecto que se ha reportado sobre este aminoácido relacionado con la liberación de insulina. Este efecto puede ser mediado por poliaminas, ya que estas moléculas se forman por la acción de esta enzima al catalizar la formación de ornitina.

El incremento que se observa con las poliaminas puede ser un reflejo del efecto que tienen estas moléculas sobre la síntesis de proteínas, entre las que podrían estar la arginasa y la alfa amilasa, lo que puede representar una mejoría en la recuperación de la función pancreática. Sin embargo, otros aspectos relacionados con el metabolismo de la arginina deben ser estudiados, ya que recientemente Schmidt et. al. (54) propusieron la hipótesis de que la liberación de insulina como respuesta a la administración de arginina y tolbutamida, es mediada por la formación de óxidos de nitrógeno derivados de arginina (figura 2), particularmente el óxido nítrico.

## CONCLUSIONES

En conclusión, poco se conoce acerca del metabolismo de las diferentes poliaminas in vivo y su relación con el páncreas y la función de las células beta, pero estos resultados apoyan el conocimiento de que la acción de la L-arginina puede estar relacionada con el metabolismo de las poliaminas en el páncreas.

Con base en los resultados obtenidos en la segunda parte se concluye que:

1. La administración i.p. de L-arginina incrementa la actividad de arginasa en el páncreas de ratas diabéticas.
2. Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina tienen acción parecida a la arginina, ya que la actividad de la arginasa se incrementa en una proporción similar en presencia de las tres poliaminas.
3. La acción de arginina y poliaminas en el páncreas es parecida a la de la insulina, aunque no alcanza los mismos valores de activación de la enzima.
4. La actividad de la arginasa puede estar relacionada con la síntesis de putrescina.

## PERSPECTIVAS

Con la realización de estos estudios se ha demostrado la relación que existe entre la L-arginina, la activación de arginasa y parcialmente con el metabolismo

de las poliaminas. Sin embargo, la medición de otros parámetros tales como insulina o péptido C en presencia de L-arginina y poliaminas es necesaria, por lo que se llevará a cabo en la siguiente fase experimental.

También se realizarán experimentos en los que se estudiará en el páncreas el efecto citoprotector de la L-arginina y de las poliaminas hacia los efectos causados por aloxana.

## REFERENCIAS

1. Orci, L., Vassalli, J.D. y Perrelet, A.: La fábrica de insulina. *Investigación y Ciencia*. 143:52-63, 1988.
2. Lacy, P.E. and Greider, M.H.: Anatomy and ultrastructural organization of pancreatic islets, in *Endocrinology*. Vol. II, Degroot, L.J., Cahill, G.F., Jr., Martini, L., Nelson, D.H., M., Oddell, W.D., Potts, J.T., Stemberger, E. and Winegrad, A.J., (Eds.) Grune & Stratford, N.Y., 1979, p. 907-919.
3. Orci, L.: Macro and micro-domains in the endocrine pancreas. *Diabetes* 31:538-565, 1982.
4. Keen, H.: Problems in the definition of diabetes mellitus and its subtypes, in the *Genetics of Diabetes Mellitus*. Serono Symposia. Vol. 47, Köbberling, J. and Tattersall, R. (Eds.). Academic Press, N.Y., 1982, p. 1-11.
5. Shuman, Ch.R.: Definition, classification and diagnosis, in *Diabetes Mellitus*. Galloway, J.A., Potvin, J.H. and Shuman, Ch. R. (Eds.) Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, USA, 1988. p. 1-13.
6. What is diabetes?, in *Joslin Diabetes Manual*, 12th, Krall, L.P. and Beaser, R.H. (Eds.). Lea & Febiger. Philadelphia, 1989. p. 1-19.
7. Fajans, S.S.: Classification and diagnosis of diabetes, in *Diabetes Mellitus*. Rifkin, H. and Porte, D. (Eds.) 4th Ed., Elsevier, N.Y. 1990, p. 346-356.
8. Rodríguez, A.C. y Nuñez, J.C.: El enzima arginasa: bioquímica general, metabolismo, interés de la determinación sérica en patología hepática, *Rev. Clin. Esp.* 123(3):213-219, 1971.
9. Méndez, J.D. y Hernández, M.P.: Efecto de la L-arginina y poliaminas sobre la movilidad espermática. *Rev. Ginec. Obstet. Mex.* 1992. (en prensa).
10. Méndez, J.D. y Sosa, A.: Bioquímica y fisiología de las glándulas sexuales accesorias. *Rev. Ginec. Obstet. Mex.* 1992 (en prensa).
11. Leahy, J.L., Bonner-Weir, S., Weir, G.C.: Abnormal glucose regulation of insulin secretion in models of reduced B-Cell Mass diabetes, 33:667-673, 1984.
12. Menchini, M., Meschi, F., Lambiase, R., Puzzovio, M. and Del Guercio, M.J.: C-peptide response to arginine stimulation in diabetic children. *J. Pediatr.*, 96(3, pt 1):362-6, 1980.
13. Solomon, S.S., Duckworth, C.W., Jallepalli, P., Bobal, M. and Iyer, R.: The glucose intolerance of acute pancreatitis: hormonal response to arginine. *Diabetes*. 29(1):22-6, 1980.
14. Curry, D.L., Safairik, and Reaven, E.: Effects of age on the insulin secretory response of perfused rat pancreas to arginine and tolbutamide. *Horm. Metab. Res.*, 19:453-57, 1987.
15. Tominaga, M., Komiya, I., Johnson, H.J., Inman, L., Alam, T. and Moltz, J.: Loss of insulin response to glucose but not arginine during the development of autoimmune diabetes in BB/rats: relationships to islet volume and glucose transport rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83: 9749-9753, 1986.

16. Fowden, A.: The effect of arginine on insulin release from the foetal sheep pancreas. *Proc. Physiol. Soc.* 64p-65p, 1977.
17. Zerbib, A., Ribes, G., Gross, R., Puech, R. and Loubatieres-Mariani, M.M.: Hypersensitivity to arginine of both B and D pancreatic cells in adult streptozotocin-diabetic rats. *Acta Endocrinológica (Copenh)*, 121:345-349, 1989.
18. Frankel, J., Barbara, E., Gerich, J., Rudolph, E.F., and Guerritsen, G.: Responses to arginine of the perfused pancreas of the genetically diabetic chinese hamster. *Diabetes*, 24(3):272-279, 1975.
19. Pousier, P., Nakhooda, F.A., Grose M., and Marliss, B.E.: Arginine-induced glucagon secretion in the spontaneously diabetic BB wistar rat. *Metabolism*, 32(5): 487-91, 1983.
20. Bandisode, M.: Effect of arginine and glucagon on perfused purified beta cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151(2), 948-53, 1988.
21. Goto, Y., Seino, Y., Taminato, I. and Imura, H.: Fructose: Inhibition of glucagon and stimulation of insulin responses to arginine in the isolated perfused rat pancreas. *J. Endocrinol.*, 69:295-296, 1976.
22. Grill, V. and Herberg, L.: Glucose and arginine-induced insulin and glucagon responses from the isolated perfused pancreas of the BB-wistar diabetic rat. Evidence for selective impairment of glucose regulation. *Acta Endocrinológica*. 102:561-566, 1983.
23. Johanson, H., Gylfe, E., and Hellman, B.: The actions of arginine and glucose on glucagon secretion are mediated by opposite effects on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 147(1):309-14, 1987.
24. Bromme, H.J., Hahn, H.J., Lucke, S., Hildebrant, W. and Blech, W.: Arginine stimulated insulin and glucagon release from islets transplanted into the liver of diabetic rats. *Horm. Metab. Res.*, 21:587-589, 1989.
25. Consoli, A., Angelucci, E., Cappani, F., Riario-Sforza, G. and Sensi, S.: Biphasic response of insulin secretion to arginine stimulation, Daily changes. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 59(1):490-3, 1983.
26. van Haeften, W.T., Voetberg, A.G., Gerich, E. J., and van der Veen, A.E.: Dose-response characteristics for arginine-stimulated insulin secretion in mass and influence of hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 69(5):1059-64, 1989.
27. Nogowski, L. and Nowak, K.W.: Arginine, administered in various ways, as a stimulator of insulin secretion in the rabbit. *Horm. Metabol. Res.*, 18:730-33, 1986.
28. Kishino, Y. and Kawamura, S.: Pancreatic damage induced by injecting a large dose of arginine. *Virchows Archive (Cell Pathol.)*, 47:147-155, 1984.
29. Méndez, J.D.: Poliaminas, en *Bioquímica e Inmunología*. Vol. II. Hicks, J.J. y Díaz-Zagoya, J.C., Facultad de Medicina, UNAM, México, 1989, pp. 365-385.
30. Méndez, J.D.: Polyamines and human reproduction, in *The Physiology of Polyamines*. Bachrach, U. and Heimer, Y. (Eds), C.R.C. Press, Inc., Florida, USA, 1989, pp. 23-38.

31. Hougaard, D.M., Nielsen, J.H. and Larsson, L-I.: Localization and biosynthesis of polyamines in insulin-producing cells. *Biochem. J.*, 238:43-47, 1986.
32. Welsh, N., and Sjöholm, A.: Polyamines and insulin production in isolate mouse pancreatic islets. *Biochem. J.*, 252:701-707, 1988.
33. Lockwood, D.M., Lipsky, J.J., Meruk, F. and East, L.E.: Actions of polyamines on lipid and glucose metabolism on fat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44(3):600-607, 1971.
34. Elgavish, A., Wallace, R.W., Pillion, D.J. and Meezan, E.: Polyamines stimulate D-glucose transport in isolated renal brush border membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Acta*, 777:1-8, 1984.
35. Johnson, W.T., Nordlie, R.: Stimulation glucose-6-phosphatase by polyamines is a membrane mediated-event. *Life Sci.* 26:297-307, 1980.
36. Douds, P.A., Dunham, J., Bitensky, L. and Chayen, J.: Putrescine may be a natural stimulator of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Letters* 201(1):105-108, 1986.
37. Mohan, C., and Bessman, S.P.: Insulin "inhibition" of gluconeogenesis by stimulation of protein synthesis. *Biochem. Med.*, 26:403-426, 1981.
38. Bernal, A., Méndez, J.D. y Rosado, A.: Determinación rápida del peso seco por colorimetría. *Arch. Invest. Med. (Méx)* 12:83-88, 1981.
39. Hougaard, D.M., Nielsen, J.H. and Larsson, L-I.: Localization and biosynthesis of polyamines in insulin-producing cells. *Biochem. J.*, 238:43-47, 1986.
40. Lamster, I.B., Mandela, R.D., Zove, S.M. and Harper, D.S.: The polyamines putrescine, spermidine and spermine in human gingival crevicular fluid. *Arch. oral Biol.*, 32(5):329-33, 1987.
41. Kung, T.J., Brooks, S.B., Jackway, J.P., Leonard, L.L. and Tamalge, D.W.: Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase
42. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
43. Malaisse, W.J., Blachier, F., Mourtada, A., Cámara, J., Albor, A., Valverde, I. and Séver, A.: Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. *Metabolism of L-arginine and L-ornithine in pancreas islets.* *Biochem. Biophys. Acta* 1013:133-143, 1989.
44. Nogowsky, L. and Nowak, K.W.: Arginine, administered in various ways, as a stimulator of insulin in the rabbit. *Horm. Metab. Res.* 18:730-733, 1986.
45. Menchini, M., Meschi, F., Lambiase, R., Puzovio, M., Del Guercio, M.J. and Chiumello, G.: C-peptide response to arginine stimulation in diabetic children. *J. Pediatrics* 19(3 P.I):362-366, 1980.
46. Solomon, S.S., Duckwort, W.C., Jallepall, P., Bobal, M.A. and Iyer, R.: The glucose intolerance of acute pancreatitis. Hormonal response to arginine. *Diabetes* 29:22-26, 1980.

47. Van Haeften, W.T., Voetberg, G.A., Gerich, J.E. and van der Veen, E.A.: Dose-response characteristics for arginine-stimulated insulin secretion in man and influence of hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69(5):1059-1064, 1989.
48. Welsh, N. and Sjöholm, A.: Polyamines and insulin production in isolated mouse pancreatic islets. *Biochem. J.*, 252:701-707, 1988.
49. Seino, Y., Nishi, S. and Imura, H.: Vagal modulation of arginine- and glucagon-induced pancreatic somatostatin secretion. *Life Sci.*, 37:651-656, 1985.
50. Curry, D.L., Safarik, R.H. and Reaven, E.: Effect on age on the insulin secretory response of perfused rat pancreas to arginine and tolbutamide. *Horm. Metab. Res.*, 19:453-457, 1987.
51. Zerbib, A., Ribes, G., Gross, R., Puech, R. and Loubatieres-Mariani, M.M.: Hypersensitivity to arginine of both B and D pancreatic cells in adult streptozotocin-diabetic rats. *Acta Endocrinológica* 121:345-349, 1989.
52. Méndez, J.D. and Arreola, M.A.: Effect of L-arginine on pancreatic arginase activity and polyamines in alloxan treated rats. *Biochemistry International* 28(4):569-575, 1992.
53. Giles, K.W. and Myers, A.: An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 206:93, 1966.
54. Schmidt, H.H.H.W., Warner, T.D., Ishii, K., Sheng, H. and Murad, F.: Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxide. *Science* 255:721-723, 1992.

## Capítulo 19

---

# Poliaminas

*José D. Méndez*

---

### Resumen

### Introducción

### Generalidades

### Distribución

### Bioquímica

Biosíntesis, interconversión y degradación en mamíferos

Inhibición

Interacción con otros ciclos metabólicos

### Efectos sobre el crecimiento

Bacterias

Hongos

Levaduras

Plantas

*Protección contra el envejecimiento y daño tisular*

Mamíferos

### Importancia clínica y perspectivas

### Referencias

---

---

### Resumen

Las células procariontes contienen putrescina y espermidina, las células eucariontes contienen además espermina. La función biológica de estas aminas ha sido estudiada en microorganismos, en células vegetales y animales. Se ha demostrado que son factores de crecimiento y que su presencia es esencial para la regulación en múltiples procesos, entre ellos la división, proliferación y diferenciación celulares.

La inhibición específica de la biosíntesis de poliaminas puede ser un medio para el control de algunos estados patológicos. Por otra parte, la determinación de la concentración de estas aminas en orina y en otros fluidos corporales, constituye en algunos casos un indicador del estado de salud.

---

## Introducción

El descubrimiento de la función de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en la regulación de diversos procesos tales como crecimiento celular, multiplicación y diferenciación, ha despertado gran interés por su estudio en diversas áreas de la investigación. Estas moléculas, a semejanza de los ácidos nucleicos, los aminoácidos y las proteínas, se encuentran distribuidas ampliamente en los sistemas vivientes, lo que quizá constituye un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de la función celular.

En este capítulo se describen algunos aspectos bioquímicos de las poliaminas y se destacan tanto la función fisiológica en microorganismos y plantas, como su importancia en los estados de salud y enfermedad humana.<sup>1</sup>

## Generalidades

La presencia de poliaminas en materiales biológicos se señaló hace más de 300 años. En 1678, Antoni van Leeuwenhoek descubrió la cristalización de la espermina en el semen humano.

En 1791, Nicolas Vauquelin redescubrió esos cristales en el semen y demostró su relativa insolubilidad en agua y etanol, concluyendo que eran sales de fosfato de un catión inorgánico, probablemente de calcio.

Muchos investigadores describieron los cristales que se depositan en el semen, sin embargo, la naturaleza de esta sustancia cristalizada se identificó claramente hasta un siglo después.

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

Se atribuye a Schreiner, en 1878, el descubrimiento de que los cristales son sales de fosfato de un compuesto orgánico básico simple.

En 1888, A. Landenburg y J. Abel, dieron el nombre de *espermina* a esta base orgánica, por encontrarse en cantidades particularmente altas en el semen humano.

Finalmente en 1926, Otto Rosenheim determinó la estructura química correcta de la espermina, sintetizando después otra base identificada como fosfato de espermidina (Fig. 19.1).

Después de dilucidar su estructura, la espermidina fue aislada de órganos de animales, microorganismos y plantas, resultando ser una poliamina universal.

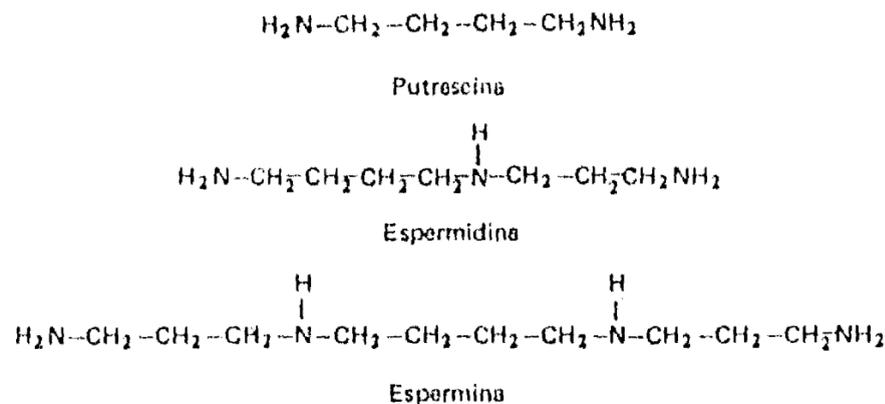


Figura 19.1 Fórmulas de las poliaminas.

El descubrimiento de la putrescina y la cadaverina se atribuye al trabajo de Brieger en 1885, quien aisló estas bases como sales dobles de metales pesados del tejido animal.

Estas bases fueron subsecuentemente aisladas a partir de muchos cultivos bacterianos, así como de tejidos de plantas y animales en diferentes estados, frecuentemente en condiciones de fermentación o putrefacción.

La putrescina, espermidina y espermina constituyen el grupo de poliaminas que ha sido más estudiado, aunque existen otras aminas que han sido detectadas en varios sistemas biológicos.

Estas aminas, además de encontrarse en forma de bases alifáticas libres, pueden existir conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos y péptidos, también como unidades subestructurales dentro de numerosas familias de alcaloides.

### Distribución

Las poliaminas están ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos, aunque las concentraciones relativas de putrescina, espermidina y espermina varían notablemente en células diferentes.

En general, los procariontes tienen más altas concentraciones de putrescina que de espermidina y, carecen de espermina.

Los eucariontes tienen generalmente bajas concentraciones de putrescina y tienen espermidina y espermina. En el cuadro 19.1, se compara la concentración de poliaminas de diversas fuentes biológicas.

CUADRO 19.1  
CONCENTRACION DE POLIAMINAS EN DIFERENTES MATERIALES BIOLÓGICOS

Material biológico	Putrescina	Espermidina	espermina
	( molas/g de peso húmedo)		
Hígado de ratón	0.01	0.61	0.82
Lóbulo frontal de cerebro humano	0.015	0.23	0.10
Próstata (rata)	--	7.73	4.77
Páncreas (rata)	--	8.62	0.80
Plasma seminal humano	0.23	0.11	3.04
<i>Escherichia coli</i>	15.0	1.5	--
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.6	--	--
<i>Pseudomonas sp</i>	4.6	--	--
<i>Lactobacillus casei</i>	--	--	0.1
<i>Shigella sonnei</i>	14.0	--	--
<i>Acetobacter vinelandii</i>	13.0	--	--
<i>Bacillus subtilis</i>	11.0	--	--
<i>Aspergillus niger</i>	4.0	--	--
<i>Aspergillus nidulans</i>	--	0.16	0.4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.5	1.4	0.6

La putrescina es el precursor de la síntesis de la espermidina y la espermina; en las células animales esta diamina se obtiene de la ornitina, sin embargo, en las células vegetales superiores en bacterias y hongos, la putrescina puede obtenerse a partir de agmatina, que a su vez es producida por la descarboxilación de arginina.

## Bioquímica

### Biosíntesis, interconversión y degradación de poliaminas en mamíferos

En los mamíferos, la biosíntesis de poliaminas se lleva a cabo a partir de ornitina (Fig. 19.2), por lo tanto, la ruta que conduce a la formación de putrescina es a través de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC).

La ornitina disponible para estas reacciones proviene del plasma, además de que puede formarse dentro de las células, por la acción de arginasa. Es posible que esta enzima, ampliamente distribuida en los diferentes tejidos, se encuentre presente en tejidos extrahepáticos para facilitar la disponibilidad de ornitina para la biosíntesis de poliaminas. Por esta razón, se ha pensado que la arginasa puede ser una de las enzimas que regulan la etapa inicial en la biosíntesis de poliaminas, debiendo recordarse que su participación fisiológica tradicionalmente estudiada se relaciona con el ciclo de la urea.

La ODC es una enzima que depende, para su actividad, de fosfato de piridoxal. 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 de crecimiento. Aun así, se ha observado que en el riñón de ratones estimulados con andrógenos, la ODC sólo constituye 0.01% de la proteína citoplásmica total y 0.00012% en el hígado de ratas estimuladas con tioacetamida.

Para convertir a la putrescina en espermidina debe adicionarse un grupo propilamina. Este grupo se deriva de la metionina, la cual primero es convertida en S-adenosilmetionina y luego descarboxilada enzimáticamente por la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMD). El producto de la descarboxilación, S-adenosilhomocisteamina, es utilizado como donador de grupos propilamina ((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>) para la síntesis de espermidina y espermina. La producción de S-adenosilhomocisteamina se mantiene baja y constituye el factor limitante en la formación de espermidina.

En esta reacción se produce metiltioadenosina, que se hidroliza por acción de la enzima metiltioadenosina fosforilasa. La adenina que resulta de esta reacción se recupera como nucleósido. La metiltiorribosa-1-fosfato es reconvertida a metionina. Este metabolismo ocurre a través de una serie de reacciones, todavía no bien caracterizadas, pero que involucran la producción secuencial de 1-fosfo-5-S-metiltioribofuranósido, 1-fosfo-5-S-metiltiorribulosa y 2-ceto-4-S-metiltiobutirato como intermediarios. Las células de mamífero contienen todas las enzimas para la biosíntesis de poliaminas, pero hay unas líneas de células tumorales que carecen de metiltioadenosina fosforilasa y excretan la metiltioadenosina producida en la biosíntesis de poliaminas.

La SAMD de los mamíferos es activada por putrescina e inhibida por espermidina; esta enzima, que depende del piruvato como cofactor, está presente en los tejidos en muy bajas concentraciones equivalentes a 0.015

de la proteína soluble en próstata ventral y a 0.0007% en hígado. Su actividad es también regulada por muchas hormonas y por otros estímulos que promueven el crecimiento.

Es importante mencionar que la incorporación de los grupos propilamina para la síntesis de espermidina y espermina se llevan a cabo por la acción de las enzimas espermidina sintetasa y espermina sintetasa, respectivamente (Fig. 19.2).

A pesar de la similitud entre estas dos reacciones, cada enzima tiene cierta especificidad por su propio sustrato. Las aminopropiltransferasas están presentes en diversas células en cantidades mayores que las descarboxilasas. Se ha pensado que son reguladas por la disponibilidad de sus sustratos, particularmente la S-adenosilhomocisteína. Sin embargo, en el caso de la espermidina sintetasa se ha observado que también se eleva en respuesta a hormonas, regeneración tisular y factores de crecimiento celulares.

Por otra parte, se ha demostrado que las reacciones catalizadas por las dos sintetastas son irreversibles, y que la conversión de la espermina en espermidina y de la espermidina en putrescina ocurre *in vivo*. Esta interconversión tiene lugar por la acción de las enzimas a) espermidina-N<sup>1</sup>-acetiltransferasa y b) poliamina oxidasa (Fig. 19.2).

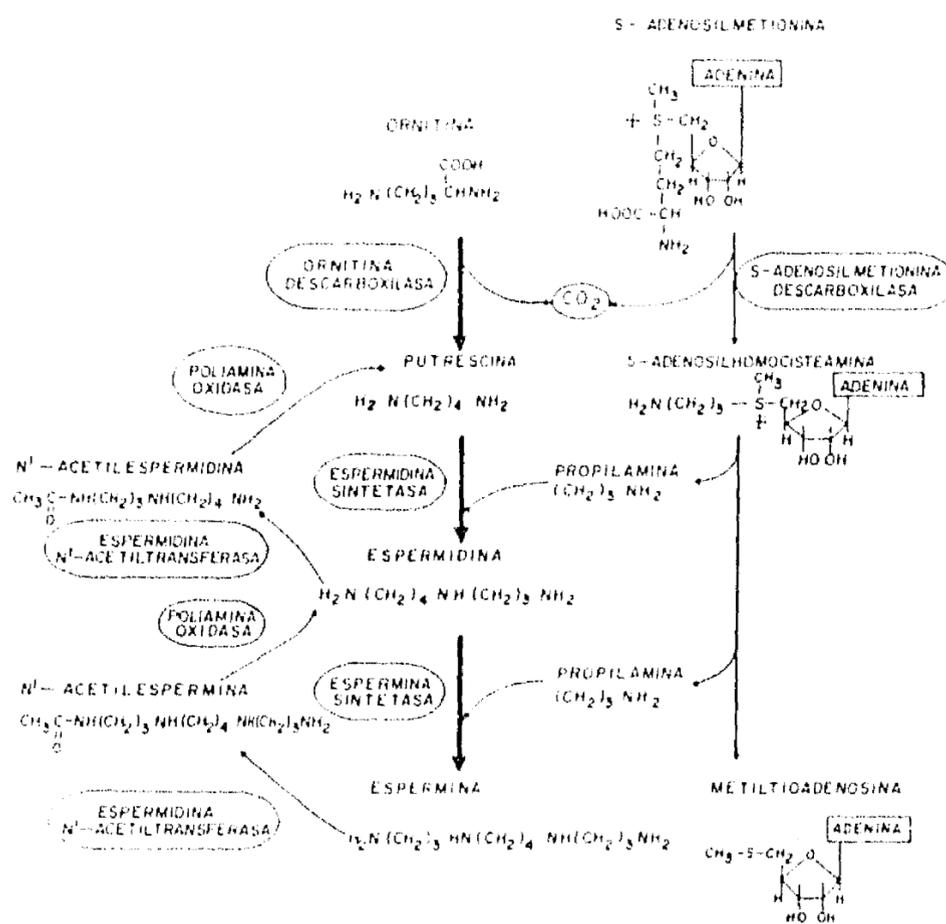


Figura 19.2 Biosíntesis de poliaminas y su interconversión en células de mamífero.

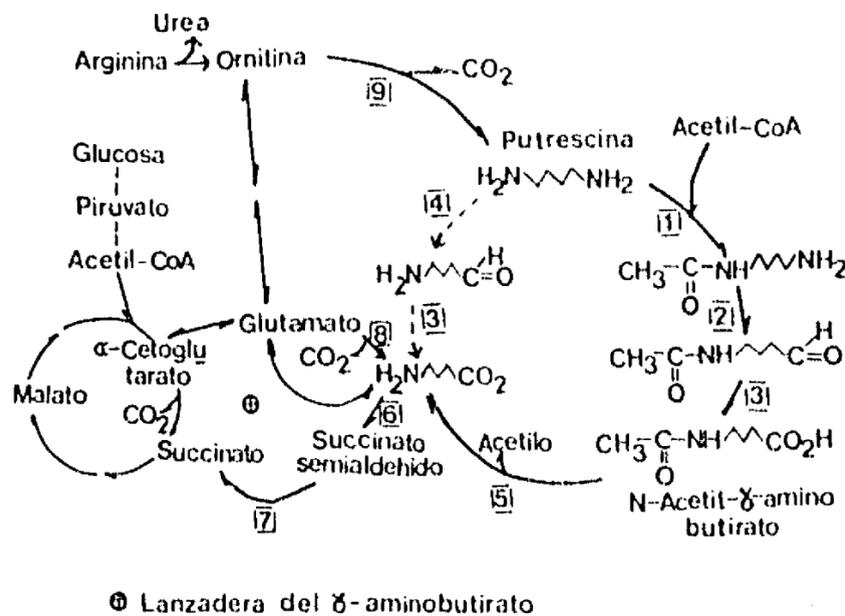
La primera enzima utiliza acetyl-Co A para convertir a la espermidina en N<sup>1</sup>-acetilespermidina y también acetila espermina, formando N<sup>1</sup>-acetilespermina. Estos derivados acetilados son buenos sustratos para la poliamina oxidasa, que los utiliza de manera eficiente, hidrolizando a nivel

del nitrógeno interno para dar N-acetilpropionaldehído y putrescina o espermidina, en función del sustrato. En virtud de que en condiciones fisiológicas los derivados acetilados son metabolizados rápidamente, se ha propuesto que la acetilación es el paso limitante en esta interconversión y se ha demostrado que la espermidina-N<sup>1</sup>-acetiltransferasa es inducida rápidamente y se incrementa marcadamente después de la exposición a agentes tóxicos, que resaltan la conversión de espermidina en putrescina y de espermina en espermidina.

En los tejidos de la rata se encuentran solamente pequeñas cantidades de los derivados acetilados, aun en el pico de inducción, ya que la actividad de la poliamina oxidasa es mayor.

En el ratón pueden encontrarse grandes cantidades de N<sup>1</sup>-acetilespermidina y de N<sup>1</sup>-acetilespermina ya que los tejidos de este animal tienen niveles veinte veces más bajos de poliamina oxidasa. Sin embargo, aun en esta especie, los derivados acetilados son degradados en unas cuantas horas.

Por otra parte, la putrescina puede ser oxidada por la diamina oxidasa, produciendo  $\gamma$ -aminobutiraldehído en lugar de convertirse a espermidina; este aldehído puede posteriormente ser oxidado a  $\gamma$ -aminobutirato (GABA), o dar origen a compuestos cíclicos. Pero la putrescina puede también ser acetilada por una enzima microsomal y la monoacetilputrescina ser oxidada por una monoamina oxidasa, para producir GABA lo que podría ocurrir en tejidos como el cerebro, que tienen baja actividad de diamina oxidasa (Fig. 19.3).



**Figura 19.3** Catabolismo de putrescina vía ácido  $\gamma$ -amino butírico  
 1. Acetil-CoA-1, 4-diaminobutano N-acetiltransferasa.  
 2. Monoamina oxidasa  
 3. Aldehído deshidrogenasa  
 4. Diamino oxidasa  
 5. Enzima desacetilante de  $\gamma$ -aminobutirato  
 6.  $\gamma$ -aminobutirato-2-cetoglutarato aminotransferasa  
 7. Succinato semialdehído deshidrogenasa  
 8. Glutamato descarboxilasa  
 9. Ornitina descarboxilasa

La acetilación de las poliaminas puede llevarse a cabo también por una enzima nuclear que, con espermidina como sustrato, forma preferentemente N<sup>8</sup>-acetil espermidina.

Las poliaminas acetiladas han sido encontradas en sangre y orina, pero en cantidades pequeñas y no es clara la importancia de la acetilación que permite la excreción de las poliaminas.

#### Inhibición de enzimas que biosintetizan poliaminas

Muchos procesos bioquímicos, tales como el transporte de nutrimentos al interior de la célula, la velocidad de síntesis de diversas macromoléculas,

así como el control de su degradación son influidos por agentes capaces de inducir crecimiento. En cambios tempranos, asociados con la transición de células de un estado quiescente a un estado de proliferación, hay un aumento en la actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas. Como resultado de esta actividad enzimática intensa, hay acumulación intracelular de poliaminas.

Aun cuando la velocidad de síntesis de estos compuestos siempre parece estar acoplada a un aumento de la proliferación celular, varios estudios están siendo realizados para demostrarse si este incremento es circunstancial o esencial para que las células entren en actividad mitótica.

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

Uno de los sistemas más estudiados sobre este aspecto ha sido el hígado en regeneración. Actualmente se investiga la relación que existe entre la embriogénesis de los mamíferos y las poliaminas.

Como se describió anteriormente en las células de los mamíferos, la biosíntesis de poliaminas involucra la acción secuencial de 2 descarboxilasas, y 2 transferasas. Muchos de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas, que han sido desarrollados para bloquear la acumulación de poliaminas *in vivo*, son dirigidos hacia las descarboxilasas (Cuadro 19.2). La  $\alpha$ -difluorometil ornitina (DFMO) es uno de los inhibidores de ODC más eficientes y su mecanismo de reacción es bien conocido. El desarrollo preferencial de inhibidores de descarboxilasas puede explicarse por dos razones:

Primera: 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.

Segunda: Los mecanismos catalíticos de las transferasas (espermidina sintetasa y espermina sintetasa) no han sido bien dilucidados.

#### Interacciones entre el ciclo de la urea, la biosíntesis de poliaminas y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

El ciclo de la urea ha sido bien identificado en su conjunto y ahora se sabe que consiste en cinco pasos, regulados enzimáticamente: 1) la conversión de bicarbonato y amonio en carbamoilfosfato; 2) formación de citrulina a partir de ornitina y carbamoilfosfato; 3) conversión de citrulina y aspartato en argininosuccinato; 4) hidrólisis de arginino-succinato para formar arginina; 5) degradación de arginina para formar urea y ornitina. La ornitina así formada está nuevamente disponible para su reutilización en el paso 2 y la urea es excretada.

Los dos pasos iniciales son catalizados por las enzimas mitocondriales, carbamoilfosfato sintetasa I y ornitina transcarbamilasa, y los tres últimos por las enzimas citoplasmáticas, argininosuccinato sintetasa, argininosuccinasa y arginasa, respectivamente.

Todas estas enzimas están presentes en el hígado, intestino y riñón, pero solamente en el hígado están en niveles suficientes para llevar a cabo la ureogénesis.

CUADRO 19.2  
INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE POLIAMINAS

Enzima	Inhibidor	Mecanismo de acción
Ornitina Descarboxilasa (ODC)	<i>Análogos de sustrato:</i>	
	A. DL- $\alpha$ -hidracinoornitina	Reversible y competitivo.
	B. DL- $\alpha$ -metilornitina	Reversible y competitivo.
	C. DL- $\alpha$ -hidracino-metilornitina	Reversible y competitivo.
	D. DL- $\alpha$ -difluorometilornitina	Irreversible
	<i>Análogos del producto:</i>	
	E. Trans-1,4-diamino-2-buteno	Reversible y competitivo.
	F. 1,4-diaminobutanona	Reversible y competitivo.
	G. 5-hexino-1,4-diamina	Irreversible
	H. Homólogos de diaminas con 3-12 átomos de carbono	Indirecto. Ej: por inducción de la proteína que inhibe a la ODC (ODC-antienzima)
I. 1,3-diamino-2-propanol	Indirecto	
S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMD)	A. Metilglioxal-bis (guanilhidrazona) (MGBG)	Reversible y competitivo con respecto al sustrato
	B. 1,1'-[(metiletano-dilideno) dinitrilo] bis-(3-aminoguanidina) (MBAG)	Reversible inicialmente y competitivo con respecto al sustrato. Luego irreversible
	C. S-adenosil-DL-2-metilmetionina	Reversible y competitivo con respecto al sustrato.
Espermidina sintetasa	A. $\gamma,\omega$ -diaminas con 3 a 12 átomos de carbono. El 1, con respecto a uno de los 5-diaminopentano es el más activo.	Reversible y competitivo con respecto a uno de los sustratos (putrescina)
Espermina sintetasa	A. $\gamma,\omega$ -diaminas con 3 a 12 átomos de carbono. El 1, con respecto a uno de los 5, diaminopentano es el más activo.	Reversible y competitivo con respecto a uno de los sustratos (espermidina)

Los componentes del ciclo de la urea en los vertebrados terrestres, como anfibios y mamíferos, están muy relacionados con el ciclo del ácido cítrico (Fig. 19.4).

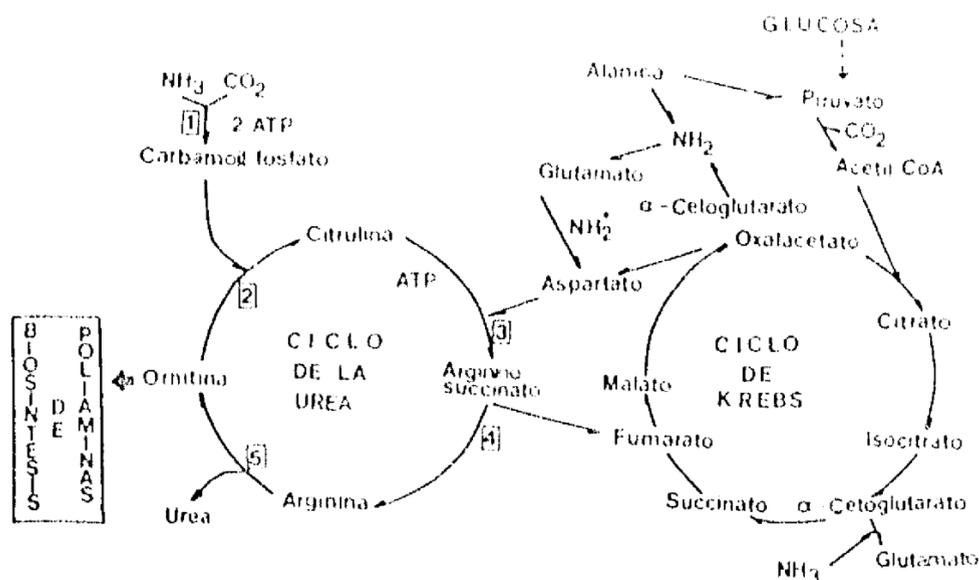
La síntesis de argininosuccinato es un paso importante en la interacción del ciclo de la urea con el ciclo del ácido cítrico. La alanina es transaminada para formar piruvato, y su grupo amino lo cede al alfa cetoglutarato, pasando éste a glutamato. El piruvato es descarboxilado, para entrar al ciclo del ácido cítrico, como un fragmento de dos carbonos.

El glutamato, por una reacción de transaminación con el oxalacetato, forma aspartato y se regenera el alfa cetoglutarato. El aspartato así formado contiene el segundo grupo amino destinado para la síntesis de urea. El fumarato que se obtiene por hidrólisis de argininosuccinato, catalizada por argininosuccinasa, regresa al ciclo del ácido cítrico y la arginina queda disponible para la síntesis de proteínas en tejidos extrahepáticos o para proseguir con el ciclo de la urea en el hígado.

**Figura 19.4** Interacciones entre el ciclo de la urea, el ciclo de Krebs y la biosíntesis de poliaminas. Las enzimas involucradas en el ciclo de la urea son:

1. Carbamoil fosfato sintetasa
2. Ornitina transcarbamilasa
3. Arginino succinato sintetasa
4. Arginino succinasa
5. Arginasa

Los asteriscos indican el origen del nitrógeno de la urea.



Por otra parte, la arginasa efectúa la conversión de arginina en urea y ornitina y así se completa el ciclo. Se ha visto que, cuando aumenta la síntesis de poliaminas aumenta la actividad de arginasa y que así se incrementa el suministro de ornitina hacia ornitina descarboxilasa (ODC).

Los componentes del ciclo de la urea funcionan como una unidad, como lo muestra el hecho de que las 5 enzimas del ciclo se incrementan en el hígado de ratas sometidas a dieta alta en proteínas. En estos animales también se incrementan las enzimas relacionadas con el ciclo de la urea, como la alanino aminotransferasa y aspartato aminotransferasa. Todo esto comprueba que el ciclo de la urea funciona como una vía metabólica.

Los pasos limitantes de este ciclo son la formación de carbamoilfosfato y la síntesis de argininosuccinato. A este respecto, se ha visto que la argininosuccinato sintetasa funciona al 60% de su actividad, por lo que en este paso debe haber limitación en la disponibilidad de sustrato, ya sea aspartato, citrulina o ATP.

A diferencia del hígado, varios tejidos extrahepáticos contienen solamente los últimos tres mecanismos enzimáticos del ciclo de la urea: en el cerebro y músculo, la biosíntesis de urea depende del aporte de citrulina que viene del hígado.

La función del ciclo de la urea es captar el grupo amino de aminoácidos y representa un sistema anabólico que requiere energía y permite la formación de esqueletos de carbono, necesarios para el metabolismo oxidativo.

Se ha demostrado que después de una hepatectomía parcial se produce un intenso crecimiento celular, y uno de los primeros hechos que se presenta, es un incremento en los niveles de ornitina descarboxilasa (ODC), la cual alcanza un pico a las 4 horas de la operación. Brebner y col. midieron la actividad de las enzimas del ciclo de la urea durante las primeras 24 horas de regeneración hepática, encontrando que en las primeras etapas de regeneración en animales sometidos a una dieta normal, hay un espectacular descenso en los niveles de las 5 enzimas del ciclo de la urea, alcanzando un nivel mínimo 4 horas después de la operación, lo cual coincide exactamente con el primer pico de la ODC.

La observación de que las 5 enzimas del ciclo de la urea siguen un comportamiento similar durante la regeneración demostró que hay una regulación concertada de las 5 enzimas. Todo esto sugiere que la actividad

de esta vía metabólica puede competir con la ODC por la ornitina y coincide con el incremento de la ornitina hepática y del amonio en plasma, durante este período.

En las 24 horas siguientes a la operación se advierte un incremento en la actividad de las enzimas del ciclo de la urea, a niveles por encima de los observados en las ratas control; este incremento en la actividad de las enzimas es una respuesta a la inadecuada capacidad del ciclo de la urea para eliminar el amoniaco en forma de urea.

Los cambios en la actividad de las enzimas del ciclo de la urea, después de la hepatectomía parcial, muestran el balance de respuestas entre estas dos vías metabólicas que están en competencia por la ornitina. En las primeras 4 horas después de la operación, los niveles de las enzimas del ciclo de la urea descienden, para que la ornitina se canalice hacia la síntesis de poliaminas, ya que éstas son necesarias para la rápida proliferación celular que tiene lugar y, posteriormente, los niveles de las enzimas se elevan para poder cumplir con la función de eliminar del organismo los desechos nitrogenados de los aminoácidos.

### **Efecto de las poliaminas en el crecimiento y proliferación celular**

Se ha demostrado en muchos sistemas celulares que las poliaminas son necesarias para el crecimiento óptimo; en la mayoría de las células esta necesidad es absoluta. (Cuadro 19.3).

#### **Bacterias**

El efecto sobre el crecimiento fue observado por primera vez por E.J. Herbst y E. Snell, quienes, en 1948, identificaron en el jugo de naranja un factor necesario para el crecimiento de *Haemophilus parainfluenzae*. El factor se identificó como la diamina, putrescina. Otros estudios demostraron que esta bacteria se desarrolla en presencia de 1,3-diaminopropano, putrescina, espermidina y otras poliaminas sintéticas similares.

Las di- y poliaminas también estimulan el crecimiento en las bacterias de los géneros *lactobacillus*, *neisseria*, *pasteurella* y *veillonella*.

Una explicación del efecto de las poliaminas como promotoras del crecimiento es que éstas son necesarias para la división de la célula bacteriana. Se ha sugerido que el DNA, las proteínas y las poliaminas deben alcanzar niveles críticos antes de que una bacteria pueda dividirse.

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 prerrequisito 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:

$G_1$ , S,  $G_2$  y M.

$G_1$  es el período entre la mitosis (M) y la síntesis de DNA (S), y  $G_2$  es el período entre S y M. La fase intermitótica ( $G_1$ , S y  $G_2$ ) se caracteriza por crecimiento celular continuo.

En la fase  $G_1$  del ciclo celular están contenidos numerosos pasos, algunos de los cuales son esenciales para el inicio de la duplicación del DNA.

La síntesis de las poliaminas se activa considerablemente durante el período de  $G_1$ , ya que estas moléculas están implicadas en la preparación de la célula para la duplicación del DNA y uno de los primeros cambios que tienen lugar después de que las células entran en  $G_1$ , es un incremento en la actividad de la ODC.

En experimentos con cepas de *E. coli* con alteraciones en la vía biosintética de las poliaminas (por mutación en la vía de arginina), se ha observado

### CUADRO 19.3 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS POLIAMINAS

1. POLIAMINAS COMO FACTORES DE CRECIMIENTO.  
En micro-organismos.  
En células de mamífero.
2. ESTABILIZACIÓN DE MEMBRANAS CELULARES.
3. ESTABILIZACIÓN DE PARTICULAS SUBCELULARES.
4. ASOCIACIÓN CON ÁCIDOS NUCLEICOS.  
Estabilización del DNA contra la desnaturalización del DNA.  
Asociación con tRNA.  
Estabilización de la forma superenrollada del DNA.  
Empacamiento del DNA en bacteriófagos.  
Estimulación de la síntesis de DNA.  
Estimulación de la síntesis de RNA.  
Modificación de la actividad de ribonucleasas.  
Estabilización del RNA recién sintetizado.
5. EFECTOS SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.  
Fijación de moléculas de tRNA a ribosomas.  
Estimulación de metilación de tRNA.  
Reemplazamiento de  $Mg^{++}$  en la reacción de aminocil tRNA sintetasa.  
Asociación con ribosomas.  
Biogénesis de partículas ribosomales.  
Fidelidad de la traducción.  
Iniciación de la traducción.  
Estimulación de la nucleotidiltransferasa de tRNA.
6. EFECTOS SOBRE VARIAS REACCIONES METABÓLICAS.  
Estimulación de nucleótido cinasas.  
Modificación de las actividades de proteínas cinasas.  
Incremento de la ADP-ribosilación de proteínas nucleares.  
Activación de fosforilasa b.  
Estimulación de lipólisis.  
Activación de colina cinasa.  
Incremento en la utilización de fructosa en espermatozoides (epidídimo).  
Inhibición de ATPasa.  
Modificación de la actividad de acetil colina esterasa.  
Inhibición de la agregación de plaquetas.  
Estimulación del metabolismo de estradiol en microsomas de hígado.

que su habilidad para dividirse depende de las concentraciones de poliaminas (putrescina 3.1 mM y espermidina 4 mM), ya sean internas o suplementadas por el medio de cultivo.

Los avances más importantes en el área de las poliaminas en los últimos años, han sido proporcionados por los estudios concernientes a la interacción de las poliaminas con los ácidos nucleicos. Esta asociación fue descrita por primera vez al encontrarse que la putrescina y la espermidina estaban unidas al DNA de algunos fagos; las poliaminas en estos fagos no se intercambian con las poliaminas del medio y se inyectan, junto con el DNA, en la célula huésped.

Se ha observado que si las poliaminas están suficientemente concentradas, producen precipitados que son insolubles en etanol al 66%, pero que pueden disociarse incrementando la fuerza iónica o el pH del medio.

La interacción de las poliaminas con los ácidos nucleicos se lleva a cabo por un enlace iónico entre los grupos amino de las poliaminas y los grupos fosfato de los ácidos nucleicos, dando como resultado la neutralización de cargas y la estabilidad de estructuras secundarias del DNA.

De esta manera se puede comprender el hecho de que las poliaminas protegen a los ácidos nucleicos contra la desnaturalización térmica y la degradación enzimática.

En *Bacillus subtilis*, por ejemplo, el DNA se desnaturaliza después de calentarse entre 70 y 75°C, pero la espermina lo protege de manera que se retiene su capacidad de transformación aun después de calentar hasta 90°C. La espermidina y las diaminas también estabilizan al DNA, pero se requieren mayores concentraciones.

Como las poliaminas estabilizan la estructura secundaria de los ácidos nucleicos contra la desnaturalización térmica, es posible que estas moléculas tengan un papel más importante en las bacterias termofílicas que en las mesofílicas.

La acción de las poliaminas es más pronunciada cuando el DNA se calienta en un medio de fuerza iónica relativamente baja, ya que otros cationes pueden competir con las poliaminas y ejercer un efecto estabilizador.

Hay pruebas de que se requiere un tamaño específico en la molécula de diamina que da una protección óptima al DNA.

Algunos análisis con rayos X han sugerido numerosas configuraciones posibles para el complejo formado entre las poliaminas y la doble cadena de DNA.

En una de las configuraciones, los grupos amino protonados forman puentes de hidrógeno con los oxígenos de los fosfatos, en el surco menor de la molécula de DNA.

Se pueden considerar otros grupos geométricos, en los cuales todos los grupos básicos de las poliaminas forman puentes de hidrógeno con los grupos fosfato de una sola cadena del DNA.

Recientemente se han encontrado pruebas de un modelo molecular, en el cual dos grupos de la espermina cargados positivamente, forman enlaces de hidrógeno con dos átomos de oxígeno adyacentes, cargados negativamente, en una cadena de DNA, para cruzar el surco menor y formar dos enlaces de hidrógeno más con los grupos fosfato adyacentes de la otra cadena.

Parece ser que todas estas configuraciones son adoptadas al azar *in vivo* y de este modo las poliaminas pueden unirse como las histonas, a lo largo de secciones de la molécula de DNA.

Las poliaminas pueden también regular la síntesis de DNA por la DNA polimerasa DNA dependiente, estimular la transcripción de RNA y, por lo tanto, favorecer la síntesis de proteínas.

También se han encontrado pruebas del papel de las poliaminas en la regulación del metabolismo del RNA en bacterias, así como en tejidos vegetales y animales.

Se sabe que, tanto en bacterias como en tejidos animales, hay una estrecha relación entre la síntesis de RNA y los niveles de espermidina; esto sugiere que las poliaminas pueden regular la síntesis de RNA y así, indirectamente, favorecer el crecimiento.

Las poliaminas a bajas concentraciones estimulan a la RNA polimerasa DNA dependiente, pero a altas concentraciones pueden inhibirla. También pueden causar una transcripción selectiva de regiones específicas del DNA.

En las bacterias, las poliaminas se encuentran asociadas principalmente con el RNA de transferencia. Se ha demostrado la presencia de putrescina, espermidina y otra poliamina no identificada en el tRNA de *E. coli*.

Por otra parte, las configuraciones inactivas de tRNA pueden ser convertidas, *in vitro*, en formas activas, por la adición de poliaminas, las cuales, probablemente refuerzan las regiones de doble hélice.

Se ha demostrado la presencia de dos moléculas de espermidina en el tRNA, lo que puede relacionarse con la funcionalidad de las diferentes moléculas de tRNA.

Muchos efectos que se han mencionado sobre el tRNA dan una posible explicación para la regulación de la síntesis de proteínas por medio de las poliaminas, aunque se han propuesto otras hipótesis. Entre éstas, hay una que sostiene que las poliaminas regulan la transcripción del DNA y, así, controlan la formación de RNA mensajero.

Otra hipótesis afirma que las poliaminas interactúan más bien con los ribosomas bacterianos, causando la asociación de las dos subunidades ribosomales y facilitando la unión de las moléculas de mRNA o rRNA.

De acuerdo con algunos autores, las poliaminas pueden neutralizar cuando menos un tercio de los grupos acídicos del RNA ribosomal en bacterias.

Las poliaminas promueven la agregación de las subunidades ribosomales en *E. coli*, *Pseudomonas* y *Salmonella typhimurium*, el grado de agregación está en función de la concentración de poliaminas. Se ha observado que el tratamiento de los ribosomas 70 S de *E. coli* con peróxido de hidrógeno provoca la disociación de estas partículas en subunidades 30 S y 50 S, y la que espermidina y la espermina, así como cationes divalentes, evitan esta disociación.

La estabilización de los ribosomas por las poliaminas puede deberse al enlace directo con los residuos de fosfato del RNA, o, alternativamente, al enlace de los ribosomas libres con las membranas celulares. Se sabe que la espermina está involucrada en la unión de los ribosomas libres con la membrana del retículo endoplásmico (0.3 a 0.5 mM, concentraciones similares a las fisiológicas) y que los ribosomas unidos son más resistentes a las ribonucleasas que los ribosomas libres.

Se ha demostrado en otra serie de efectos que las poliaminas también se unen a las paredes celulares y membranas de las bacterias; este fenómeno puede relacionarse con la estabilización de los esferoplastos bacterianos y su protección contra el choque osmótico.

Algunos estudios sugieren que la espermina puede servir como agente estabilizante: estos estudios, hechos en bacterias como *Neisseria perflava*, *Pasteurella tularensis* y *Staphylococcus aureus*, demuestran que la espermina, a bajas concentraciones, permite el mantenimiento de la viabilidad de estas células en condiciones adversas (suspendidas o lavadas en agua).

Por otra parte, se ha demostrado que la espermina no interfiere con la actividad de la lisozima usada en la preparación de protoplastos, pero evita el rompimiento de los constituyentes intracelulares, además de que, en presencia de esta poliamina, la mayor parte de las proteínas y de los ácidos nucleicos son retenidos dentro del protoplasto.

En otras bacterias, las marinas, por ejemplo, se requieren concentraciones relativamente altas de iones de sodio para su crecimiento óptimo; ocurre una lisis rápida cuando se suspenden en agua destilada; tales bacterias pueden preservarse por medio de la espermina, que las protege del choque osmótico y de la degradación enzimática de la envoltura celular.

En estos efectos, la poliamina más activa es la espermina y la estabilización de las bacterias o de los protoplastos implica la unión de esta poliamina a las membranas citoplásmicas bacterianas.

### Hongos

En el campo de la micología, los estudios con poliaminas no son tan detallados como en el caso de las bacterias, pero la importancia de las poliaminas en su fisiología ha sido bien demostrada.

Se sabe que en los hongos como *Aspergillus nidulans*, hay cantidades apreciables de espermina, a diferencia de las bacterias, en las que predominan la putrescina y la espermidina. Ambas poliaminas son requerimientos absolutos para el crecimiento de mutantes de *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa*.

El metabolismo de las poliaminas en los hongos es similar al de las bacterias.

### Levaduras

En las levaduras, las poliaminas tienen funciones similares a las que realizan en las bacterias.

Se sabe que la adición de espermina a un cultivo de levaduras estimula el crecimiento.

Se ha estudiado el papel de las poliaminas en la germinación y crecimiento en ascosporas de *Saccharomyces cerevisiae*, usando  $\alpha$ -metilornitina para bloquear la síntesis de poliaminas; se encontró que las esporas en germinación son capaces de progresar a través del primer ciclo celular, pero el crecimiento subsecuente se retardó, aunque no se detuvo completamente. Los datos sugieren que la síntesis de poliaminas puede ser esencial para la meiosis y la esporulación.

En cuanto a la acción de las poliaminas a nivel de los ácidos nucleicos de las levaduras, existen experimentos que demuestran que estos compuestos son capaces de proteger al RNA de levaduras, contra la desnaturalización térmica y la degradación enzimática; también regulan la síntesis de proteínas.

## Plantas

El interés por estudiar el metabolismo de las poliaminas en los vegetales es el resultado de varias investigaciones que indican que estas moléculas pueden ser consideradas como factores de crecimiento para las células vegetales, ya que participan en el proceso de germinación de las semillas; están asociadas con una proliferación celular rápida durante el crecimiento de las plantas y se requieren para sintetizar nuevas paredes durante el proceso de regeneración vegetal.

Se han encontrado grandes cantidades de putrescina en cultivos de tabaco y en tejidos vegetales con división celular rápida, tales como los meristemos de tomate y papa y en el desarrollo de raíces de *Phaseolus* (frijol) y semillas de arroz, también en el endospermo de coco.

Las plantas superiores son particularmente útiles como fuente para cultivos de células y tejidos *in vitro*, y representan un buen modelo para estudiar la relación existente entre las poliaminas y el crecimiento de tejidos sanos y tumorales, en diferentes estados de desarrollo. Para obtener información de los posibles papeles de las poliaminas en el crecimiento de plantas y en sus procesos de desarrollo, se ha estudiado la distribución de las poliaminas y los niveles de la actividad de arginina descarboxilasa (ADC) y ODC a través de los axones de dos órganos de crecimiento activo en semillas de maíz: a) coleóptilos, en los cuales no hay división o cambios en los patrones y en donde el crecimiento es debido al alargamiento celular, b) raíces en las que la división celular está localizada en el meristemo apical y las secuencias ordenadas de alargamiento y diferenciación celular pueden ser previstas; también fue demostrado el crecimiento en plántulas de *Helianthus tuberosus* (alcachofa de Jerusalem), cultivando el túbulo *in vitro*. Los bajos niveles de poliaminas endógenas, ácido indolacético (IAA), citoquinas y giberelina y los altos niveles de inhibidores como el ácido abscísico, cuando el tubo está latente, no permiten la proliferación celular, pero cuando se suministra de 10-100  $\mu\text{M}$  de los activadores, las células tubulares son capaces de dividirse y crecer. *Helianthus tuberosus* tiene otras ventajas, como la de propagarse por reproducción vegetativa; está provisto de tejido homogéneo (la misma población celular) durante varios años y, en estado latente, la célula del parénquima representa la mayor parte del tubérculo en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular.

El requerimiento de poliaminas para el crecimiento de *Helianthus tuberosus* es debido a una deficiencia temporal de éstas durante el estado latente. En plantas de chícharo etiolado, los cotiledones actúan como fuente de los materiales que se requieren para el crecimiento rápido de raíces y brotes. Se ha demostrado que el crecimiento activo de tejidos habitados y tumorales en túbulos de polen, brotes de papa, fruto del tomate, así como en embriones y en diferentes órganos está relacionado con el contenido de poliaminas y su metabolismo.

En suma, las poliaminas presentan una respuesta al estímulo del medio ambiente y de fitorreguladores. Las poliaminas parecen ser los factores más importantes involucrados en el crecimiento y su regulación, y existen posibilidades de que puedan tener alguna conexión con el crecimiento anormal de células tumorales.

Uno de los mejores métodos para estudiar el significado fisiológico de las poliaminas en los procesos de crecimiento celular y los mecanismos en los que pueden estar involucrados es el uso de: a) plántulas cultivadas en condiciones estériles, b) inhibidores que interfieran con las vías de síntesis.

Algunas pruebas de la participación de las poliaminas en el crecimiento son: a) cortes de los túbulos latentes de *Helianthus tuberosus*, que pueden hacerse crecer por la aplicación exógena de auxina o poliaminas, aunque en condiciones fisiológicas es mayor la síntesis de poliaminas que de auxina; b) las células tumorales son ricas en poliaminas, pudiendo contener hasta 100 veces más del contenido normal de poliaminas; c) la germinación de tubérculos de papa y semillas está acompañada por un repentino incremento de poliaminas; d) la polinización inducida, el alargamiento de ovarios de tomate dentro del fruto, dependen de la biosíntesis de poliaminas; e) estabilización de membranas por poliaminas.

Cuando se rebaja el tejido parenquimatoso, se elimina el estado latente, pero si se cultiva *in vitro*, sin fitorreguladores exógenos, no se divide; por el contrario, cuando entra en contacto con el fitorregulador apropiado, en gran número de células cambia sus funciones de células parenquimatosas a células meristemáticas, que son inducidas a dividirse sincrónicamente al menos por 2-3 ciclos celulares.

El crecimiento del tejido en plantas resulta de una interacción entre fitorreguladores, tales como auxinas, giberelinas y citocininas y de las modulaciones del fitocromo a través de la luz, que dirigen el marcado incremento en la concentración de poliaminas. Esta respuesta a una variedad de estímulos se debe a que las poliaminas no son realmente transportadas en el tejido de la planta, por lo que se ha propuesto que la función de las poliaminas puede ser la de *mensajero intracelular*.

Muchos de los efectos morfogenéticos inducidos por espermina y espermidina, tales como la división en el primer ciclo celular, y la diferenciación de las yemas vasculares, son muy similares a los inducidos por otros fitorreguladores. Los efectos del ácido giberélico ( $GA_3$ ) y de las poliaminas son similares, incrementándose la putrescina y espermidina hasta 5 veces después del tratamiento con  $GA_3$ . Las poliaminas inducen efectos morfogenéticos y fisiológicos similares a las auxinas, como la formación de raíces; excluyendo la extensión celular, una parte de los efectos del ácido indolacético depende de una activación con auxinas; la diferenciación histológica inducida por poliaminas es similar a la inducida por IAA, el fitorregulador más importante en los procesos de alargamiento o división celular. La síntesis y acumulación de poliaminas inducida por IAA se incrementa hasta 10-20 veces cuando el tubo comienza a crecer.

Cuando las poliaminas son administradas en el medio, estimulan la división celular por sí mismas, pero no pueden inducir el alargamiento celular.

La luz roja induce el crecimiento de retoños o yemas en el chícharo, pero, con aplicación de  $GA_3$  esta luz inhibe la acción de las giberelinas. La inhibición de la actividad de ADC por luz roja puede ser revertida por  $GA_3$ , pero el  $GA_3$  no tiene efecto en la actividad de ADC en la oscuridad.

Las poliaminas tienen un efecto estabilizante en las membranas; esto se ha demostrado en las raíces de betabel, posiblemente como resultado de su unión con los componentes fosfolipídicos de las membranas, además de que las poliaminas modifican la fluidez por la estabilización de la membrana. Los iones calcio siguen patrones similares a las poliaminas a través de altas concentraciones, pudiendo actuar la espermina como un sustituto del calcio a concentraciones elevadas.

Se han correlacionado elevados niveles de poliaminas y actividad de ADC con la presentación de la embriogénesis en cultivos. La embriogénesis es inducida por auxinas, siendo la zanahoria una de las especies más

estudiadas. Los axones embrionarios producen factores de crecimiento, los cuales controlan directamente la formación de los cotiledones o endospermo. Los niveles de putrescina y espermidina se elevaron en las células embrionarias, pero la espermidina presentó niveles bajos, por lo que los cambios sugieren que las poliaminas pueden estar involucradas en la diferenciación celular durante la embriogénesis. En las células embrionarias de zanahoria, la arginina es el principal precursor de la síntesis de poliaminas.

Los brotes de papa, el tejido embriogénico de zanahoria, la formación de la raíz del garbanzo y el desarrollo del fruto del tomate, están acompañados por un alto contenido de poliaminas o por un alto porcentaje de biosíntesis de putrescina, observándose un incremento similar de ADC y ODC. La actividad de ODC se asocia con un crecimiento proliferativo rápido en plantas y la ADC afecta sólo a la diferenciación embrionaria y es la responsable del incremento en putrescina en hojas de avena sujetas a choque osmótico. La actividad de ODC es baja en tejidos latentes, pero espectacularmente alta en sistemas de proliferación celular rápida, como el crecimiento tumoral y durante la exposición al calor y choque, la presencia de concentraciones altas en aminoácidos, la administración de hormonas de crecimiento y la adición de medio fresco.

El incremento de ADC se ha observado también en tejidos de zanahoria después de transferirlo a un medio embriogénico; en células de tabaco, crecidas *in vitro*, y en el desarrollo de ovarios de tomate, se incrementó la actividad de ODC durante la proliferación celular; los mismos hechos se observaron en *Helianthus tuberosus*. Un incremento en la actividad de ADC se presenta antes de la estimulación del crecimiento longitudinal, implicando posiblemente un *efecto-causa* relacionado con la inducción de GA<sub>1</sub> en la biosíntesis de poliaminas y en el crecimiento. Las poliaminas tienen una amplia función en el desarrollo embrionario de la planta, mostrando la zanahoria silvestre mayor actividad de ODC que de ADC.

Una elevación de ADC (38 veces) y putrescina (15 veces), se presenta en una fase muy temprana de crecimiento embrionario; altos niveles de ADC favorecen la ruta ARG → AGM → PUTRESCINA en el crecimiento y desarrollo. En la raíz, la actividad de ADC es aproximadamente la misma, siendo de 3-4 veces más baja en la punta. En coleóptilos la actividad de la ADC es más baja que la de ODC, y es más activa en la base que en el ápice.

El bloqueo de las actividades de ODC y ADC por inhibidores previene la estimulación del crecimiento. Por ejemplo, la metilgloxalbisguanilhidrazona (MGBG) reduce el crecimiento de las plántulas, y la inhibición es posible por una acumulación o una disminución en los niveles de arginina endógena durante el proceso de crecimiento.

Cultivos de células de zanahoria, tratados con difluorometilarginina (DFMA), 1 mM exhiben cerca del 50% de reducción en la formación del embrión. La adición de putrescina, espermidina y espermina en el medio de cultivo restaura la embriogénesis; además la interconversión de las poliaminas hacia la putrescina se suma a estos resultados. Estos hallazgos demuestran claramente la necesidad de las poliaminas para el crecimiento.

Los tejidos de plantas en estado activo contienen en general suficiente cantidad de poliaminas para los requerimientos metabólicos; son almacenadas, como se observó en *Helianthus tuberosus*, por ello la suplementación exógena de poliaminas puede tener efectos inhibitorios; por el contrario, la suplementación en tejidos que contienen una cantidad baja de poliaminas

durante el estado latente en tubérculos, puede ser eficaz, ya que van a estimular el crecimiento. La suplementación exógena en *Helianthus tuberosus*, reemplaza la síntesis natural de poliaminas que ocurre cuando el tubérculo es tomado del estado latente, cambiando las células parenquimatosas a células meristemáticas e iniciando la división. Las poliaminas exógenas son capaces de estimular la división celular en cultivos *in vitro*, siendo aplicados usualmente a concentraciones de 100-1000 veces.

Las poliaminas no son transportadas *in vivo*, pero sus aminoácidos precursores son transportados por la planta a los puntos de crecimiento activo, en donde son convertidos a poliaminas, aunque es posible que el transporte de poliaminas se realice dentro de la fracción del axón.

En las raíces sólo se puede detectar espermina libre en los extremos apicales que tienen actividad meristemática, pero no en las regiones basales. La acumulación del contenido de espermina que se puede llegar a presentar se explica por el hecho de que la putrescina inhibe la síntesis de espermina, por competencia con la espermidina. Cuando el contenido de putrescina decrece, por falta de ornitina o poliaminas, la espermidina compite más favorablemente por el sitio activo, produciendo un incremento de espermina.

En los tres casos más estudiados, zanahoria, tabaco y *Scorzonera hispanica* (escorzonera), un cambio en la morfología fue acompañado de cambios en los niveles de poliaminas y, principalmente, en putrescina. Las alteraciones en los niveles no son necesariamente acompañados por cambios similares en otras poliaminas; por ejemplo, la putrescina puede incrementarse, mientras que la espermina decrece. Durante el inicio de la fase de expansión celular, la relación putrescina/espermidina disminuye en los axones embrionarios y en los cotiledones en la semilla de soya en desarrollo; en los cotiledones parece que se debe a un aumento en los niveles de espermidina, a expensas de putrescina preexistente, mientras que en los axones es debido aparentemente a una conversión activa de putrescina recién sintetizada; esto sugiere que la relación de putrescina/espermidina está inversamente relacionada con la actividad de la biosíntesis de macromoléculas; en otras palabras, la síntesis de espermidina puede ser importante en los procesos de desarrollo.

En los axones embrionarios de semillas cosechadas, están presentes cantidades considerables de espermina y espermidina, excepto en semillas de algodón, que presentan un nivel relativamente bajo de espermina. La putrescina está presente e niveles altos en los axones de cebada, maíz, chícharo; la relación molar de espermina y espermidina es 0.1:0.45.

Una gran cantidad de putrescina y espermidina, pero no de espermina, se detectó siempre en todos los tumores examinados en plantas, y parece independiente de los agentes etiológicos relacionados con los diferentes grados de crecimiento de los tejidos, los niveles de putrescina y espermidina fueron superiores en el tejido tumoral (el "crow gall", es el tipo de tumor, de escorzonera, que ha sido más estudiado) con respecto al tejido habitado. En general dichos niveles fueron 100 veces superiores en el tejido tumoral, mientras que la espermina mostró la mitad del nivel en el tumor, comparado con el normal.

Las altas concentraciones de poliaminas tienen un efecto de deterioro, porque inducen cromosomas anormales; la replicación del DNA es más sensible a la deficiencia de poliaminas que otros sucesos del ciclo celular, por lo que la falta de poliaminas puede aumentar las aberraciones cromosómicas en las células acumuladas en la fase G<sub>2</sub>.

La diferenciación embrionaria en células cancerígenas *in vitro*, inducida por DIMO, sugiere que las poliaminas pueden tener funciones muy amplias en diferentes tipos de células; parece, por lo tanto, que las poliaminas y sus enzimas biosintéticas son esenciales para la diferenciación en numerosas especies y tipos celulares.

Los diversos mutantes del tabaco con elevados niveles de poliaminas, presentan el meristemo floral anormal; esto sugiere que el desarrollo floral es muy sensible a las perturbaciones metabólicas, y tal vez los gradientes de poliaminas están involucrados en la determinación del desarrollo de los meristemos florales. El crecimiento activo y la división celular de tumores de *Scorzonera hispanica* y *sesamum* (escorzonera y sésamo), tejidos habitados a *Nicotiana glauca* (tabaco), se correlacionan con niveles altos de putrescina y espermidina.

La diferencia entre los tumores vegetales y los animales es la falta de metástasis en los primeros y, a pesar de esta diferencia, existe una substancial identidad en el mecanismo básico de la neoplasia.

#### *Protección contra el envejecimiento y el daño tisular*

Investigaciones recientes indican que las poliaminas pueden desempeñar un papel regulador importante en una gran variedad de células y tejidos vegetales, que son sometidos a condiciones adversas tales como envejecimiento, calor, salinidad, heridas, etc. La aplicación exógena de poliaminas, así como de lisina y arginina, retarda el envejecimiento progresivo de protoplastos de hojas de avena (*Avena sativa*), estabilizándolos, favoreciendo una alta incorporación de uridina y leucina en las macromoléculas, y aumentando la actividad mitótica. Estos hallazgos se han reproducido en diversas especies y se ha demostrado que las poliaminas detienen la degradación de la clorofila e inhiben las actividades de ribonucleasa-proteasa. También se ha comprobado que las poliaminas ejercen un efecto protector sobre la germinación de las semillas a altas temperaturas. Otras observaciones indican que las poliaminas pueden estabilizar a las membranas durante el envejecimiento.

Estos hallazgos sugieren que las poliaminas pueden desempeñar un papel importante en el control del crecimiento y envejecimiento de las plantas en general, y particularmente de aquellas plantas que crecen en condiciones medioambientales adversas.

#### **Mamíferos**

En los mamíferos, incluyendo al hombre, la espermidina y la espermina están presentes en la mayor parte de los tejidos, en una concentración aproximada de 1 mM, mientras que la putrescina está generalmente presente en concentraciones bajas, excepto en tejidos que están estimulados al crecimiento o que tienen un compartimiento celular proliferativo, como es el caso de la médula. En el cuadro 19.4, se presentan algunos ejemplos de sistemas en los que hay incremento notable en la concentración de poliaminas.

El metabolismo de poliaminas ha sido estudiado en animales y en humanos, durante la gestación y en diferentes condiciones de salud y enfermedad.

Campbell ha hecho una descripción amplia de la participación de las poliaminas, en relación con sucesos normales, trastornos del crecimiento,

**CUADRO 19.4**  
**ALGUNAS CONDICIONES EN**  
**LAS QUE SE INCREMENTA LA**  
**SÍNTESIS DE POLIAMINAS**

Embarazo
Feto y recién nacido
Acromegalia
Neoplasias
Psoriasis

enfermedades genéticas y otras alteraciones relacionadas con la fisiología renal.

Los patrones de acumulación de las poliaminas, espermidina y espermina y de su precursor putrescina, se han determinado durante el crecimiento y diferenciación de células normales y neoplásicas, en cultivo y en tejidos de animales. Una relación espermidina-espermina menor de 1.0 es típica de tejidos con actividad biosintética baja o de tejidos diferenciados con una velocidad constante en la síntesis de RNA y de proteínas.

Una relación mayor de 2.0, es típica de un tejido que presenta hipertrofia o hiperplasia. La concentración de espermina es mayor en tejidos diferenciados, disminuye durante los procesos de diferenciación, como en la regeneración del hígado, y es constante con la edad.

Los niveles intracelulares de poliaminas, particularmente espermina y putrescina, aumentan espectacularmente con el crecimiento, tanto en células normales como neoplásicas.

El hecho de que las poliaminas se puedan detectar extracelularmente, ha conducido a la realización de varios trabajos tendientes a cuantificarlas en fluidos biológicos de diversas entidades clínicas.

### **Importancia clínica y perspectivas**

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.

Un ejemplo es el cáncer de próstata, que está considerado como una causa de alta incidencia de mortalidad. Los niveles de poliaminas en el cuerpo humano están normalmente elevados en esta glándula lo que condujo a estudiar su participación en los procesos normales y patológicos de la próstata.

Con base en las observaciones anteriores y en el hecho de que también se encuentran altas las 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.

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

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

Estos resultados mostraron una respuesta clínica parcial con desaparición de la hematospermina, después de la administración oral de 18 g de DFMO/día (I.D., 5g/kg peso) durante un mes. Algunos parámetros bioquímicos, tales como gama glutamiltransferasa, hormona luteinizante, testosterona en semen, así como vitalidad y movilidad espermática, mostraron cambios importantes en pacientes tratados con DFMO, induciendo 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 dos 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.

También se ha demostrado que se encuentran elevados los niveles de poliaminas en suero, orina y líquido cefalorraquídeo en pacientes con neoplasias diversas, incluyendo algunos tipos de leucemias, en psoriasis, en fibrosis quística y en otras enfermedades.

### Referencias

- Bachrach, U. (1973): Functions of naturally occurring polyamines. Acad. Press, New York.
- Bagni, N., Serafini Fracassini, D. y Torrigiani, P.: (1981) Polyamines and growth in higher plants. In: *Advances in Polyamine Research*. Vol. 3, Calderera, C.M. Ed., Raven Press, New York.
- Méndez, J.D.: (1987) Polyamines and human reproduction. In: *The Physiology of Polyamines*. Bachrach, U. and Heimer, Y. (Eds.) CRC Press, Inc. Florida, USA.
- Méndez, J.D., Díaz-Flores, M., Durán, G. y Hicks, J.J.: (1983) Inhibition of rat embryonic development by the intrauterine administration of difluoromethylornithine. *Contraception* 28 (1): 93.
- Méndez, J.D. y Hicks, J.J.: (1983) Metabolismo y función de las poliaminas en las células vegetales. *Rev. Soc. Quim. Mex* 27 (4): 169.
- Méndez, J.D., Yáñez, R., Wong, C. y Hicks, J.J.: (1986) Uterine arginase inhibition affect the rat embryonic development. *Contraception* 33 (6): 597.
- Méndez, J.D. y Hicks, J.J. (1987): Metabolismo de poliaminas en microorganismos. *Rev. Soc. Quim. Méx* 31(1,2,3):4.
- Russel, D.H.: (1983) Clinical relevance of polyamines. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci* 18(3): 261.
- Labor, W.C. y Tabor, H.: (1984) Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* 33: 749.

## Chapter 2

## POLYAMINES AND HUMAN REPRODUCTION

José D. Méndez

## TABLE OF CONTENTS

I.	Introduction .....	24
II.	Polyamine Metabolism in the Woman .....	24
A.	Menstrual Cycle .....	25
B.	Polyamine Levels in Placenta .....	25
C.	Amine Oxidases and Pregnancy .....	26
D.	Polyamine Oxidase and Abortion .....	27
E.	Preeclampsia .....	29
1.	Perspectives on the Inhibition of Uterine Ornithine Decarboxylase Activity .....	30
III.	Physiology of Polyamines in the Male Reproductive System .....	32
A.	Testis .....	32
B.	Prostate .....	32
C.	Semen .....	32
1.	Correlation of Seminal Polyamine and Metabolizing Enzyme Levels with Sperm Count and Motility .....	33
2.	Inhibition of Human Spermatozoa Ornithine Decarboxylase and its Effect on In Vitro Fertilization .....	34
IV.	Urinary Polyamines in Prostate Cancer .....	34
V.	Polyamines in Prostatitis Treatment .....	34
VI.	Summary and Conclusions .....	35
	References .....	35

## I. INTRODUCTION

Mammalian cells contain significant amounts of the polyamines putrescine, spermidine, and spermine, which play different roles in various tissues. Although the physiological function of these amines is still not well understood at the molecular level, recent studies have shown that their concentrations are tightly regulated and that normal cellular growth, multiplication, and differentiation require polyamines.<sup>1</sup> In several systems the requirement of these aliphatic amines for growth and differentiation has been established and data supporting their role in DNA, RNA, and protein biosynthesis and/or regulation are extensive. During embryogenesis and in other rapidly growing systems cell proliferation is closely related to polyamine biosynthesis and accumulation.<sup>2</sup>

Most of the polyamine biosynthetic enzymes are localized in the cytosol. However, some controversy has arisen over the subcellular distribution of ornithine decarboxylase (ODC) which catalyzes the initial step in polyamine biosynthesis. Studies in which enzyme activity was assayed in extracts of different subcellular fractions suggested that ODC is present almost exclusively in the cytosolic compartment of the cells.<sup>3,6</sup> Recent biochemical studies indicated that ODC is present in the nucleolus and plays an important role in its activity.<sup>7</sup> Emanuelsson and Heby, using complex formation with labeled D,L- $\alpha$ -difluoromethylornithine (DFMO), an enzyme-activated irreversible inhibitor of ODC,<sup>8</sup> demonstrated that ODC is present not only in the cytoplasm, but also in the nucleoplasm of metabolically active polychaete cells.<sup>9</sup> Moreover, it has been suggested that ODC plays a multifunctional role in both polyamine synthesis and ribosomal gene expression.<sup>10</sup> Polyamines increase the efficiency of several biosynthetic reactions during the cell cycle.<sup>10,11</sup> The biosynthetic pathway for polyamines has been extensively studied and a great number of functions have been attributed to these substances.<sup>12,14</sup> In addition, numerous hormones increase the rate of polyamine biosynthesis in specific target tissues, suggesting that polyamines may in part function as mediators of hormone action.

In mammals ODC catalyzes the formation of putrescine from ornithine. This reaction is described elsewhere.<sup>12,15</sup> Another decarboxylase, S-adenosyl-L-methionine decarboxylase (SAMDC), and spermine and spermidine synthases are also needed for polyamine biosynthesis. Amine oxidases are implicated in polyamine catabolism.<sup>1,12,16</sup>

Ornithine is available for these reactions and can be formed within the cell by the action of arginase.<sup>17</sup> It is possible that arginase, which plays an important role in the urea cycle, is present in extrahepatic tissues to supply the ornithine required for polyamine synthesis. For this reason it is believed that arginase may be one of the enzymes which regulate the initial phase of polyamine biosynthesis, in addition to its well-known function in the urea cycle.

In recent years direct evidence has been obtained that ODC (and/or polyamine generated through its action) play an essential role in the early phases of reproductive processes. In mice, rat, and rabbits, oral administration of DFMO results in the inhibition of ODC activity and in a subsequent block in embryonic development.<sup>2</sup> Similar results are observed during the i.p. or intrauterine administration of DFMO into rats.<sup>18,19</sup>

The role of polyamines in human reproductive systems has been reviewed by Williams-Ashman<sup>20,21</sup> and Shet and Moodbidri.<sup>22</sup>

In this review the role of polyamines in human reproductive physiology will be discussed.

## II. POLYAMINE METABOLISM IN THE WOMAN

In women, the polyamine metabolism has been studied during normal menstrual cycle, in maternal blood, urine, placenta, and amniotic fluid as normal pregnancy progresses, as well as in women with spontaneous abortion and preeclampsia.

**Table I**  
**ODC ACTIVITY AND POLYAMINE LEVELS IN TISSUES OF NORMAL HUMAN ENDOMETRIUM AND MYOMETRIUM**

Tissue sample	ODC activity (picomoles of putrescine per milligram of protein)	Polyamines (picomoles per milligram of DNA)		
		Putrescine	Spermidine	Spermine
Normal endometrium (n = 27)	723 ± 286.4	40.2 ± 17.1	94.5 ± 31.2	125.0 ± 36.1
Normal myometrium (n = 12)	Nondetectable	10.8 ± 3.5	62.5 ± 19.1	113.2 ± 30.9

*Note.* Values are mean ± SD and n = number of samples.

From Romano, M., Cecco, L., Santarose, M. A., Cerra, M., Rasquinelli, R., Pagnano, A. M., and Paladini, A., *Advances in Polyamines in Biomedical Sciences*, Caldarella, C. M. and Bachrach, U., Eds., CLUEB, Bologna, Italy, 1984, 145.

### A. Menstrual Cycle

ODC activity and polyamine levels have been determined in normal human endometrium.<sup>23</sup> ODC activity is high in the normal endometrium, and is low in the myometrium (Table I). The activity of ODC in the endometrium has been associated with high biological activity due to its continuous morphological and functional modifications. In contrast, the myometrium, having a different biological activity, showed no detectable ODC activity and lower values of polyamine concentration. The concentrations of polyamines are higher in the endometrium than in the myometrium. In both, spermine concentrations are higher than those of spermidine and spermidine is higher than putrescine.

Osterberg et al.<sup>24</sup> studied the fluctuations in urinary putrescine, spermidine, and spermine during the menstrual cycle of healthy women and found that the excretion of all three polyamines ("total polyamines") was higher during menstruation.<sup>24</sup> In some cases urinary polyamines were elevated during the early follicular phase.<sup>24</sup> In addition to the increased polyamine excretion observed during menstruation all the women studied by these authors exhibited one or several midcycle peaks in polyamine excretion during the expected time of ovulation. During the luteal and follicular phases, polyamines accumulated in the urine of some women. However, the elevated levels of urinary polyamines in these phases was not consistently present in all women and does not appear to reflect events related to the menstrual cycle. Rather, these peaks may be a function of diet. Preliminary observations suggested that the composition of the food may modify the excretion of urinary polyamines.<sup>24</sup> It is tempting to speculate that the increase in urinary polyamines during menstruation may be related to the necrosis of endometrial cells. Indeed, polyamines were shown to accumulate in the extracellular fluid as a result of cell death.<sup>25</sup>

### B. Polyamine Levels in Placenta

Polyamine concentrations increase in the plasma and urine of pregnant women as a function of the gestational age.<sup>26-27</sup> The placenta plays a central role in fetal growth and development; therefore, this tissue could be a primary target for the increased polyamine biosynthesis observed during pregnancy. Porta et al.<sup>28</sup> studied the polyamine content of human placenta at different stages of fetal development. Figure 1 shows that the highest concentrations of putrescine in the placenta were found soon after its formation. During placental development putrescine levels declined and were negligible prior to term. Spermidine concentrations declined during gestation and remained fairly constant at low levels from the 25th week of pregnancy. On the other hand, spermine levels increased continuously almost until term.

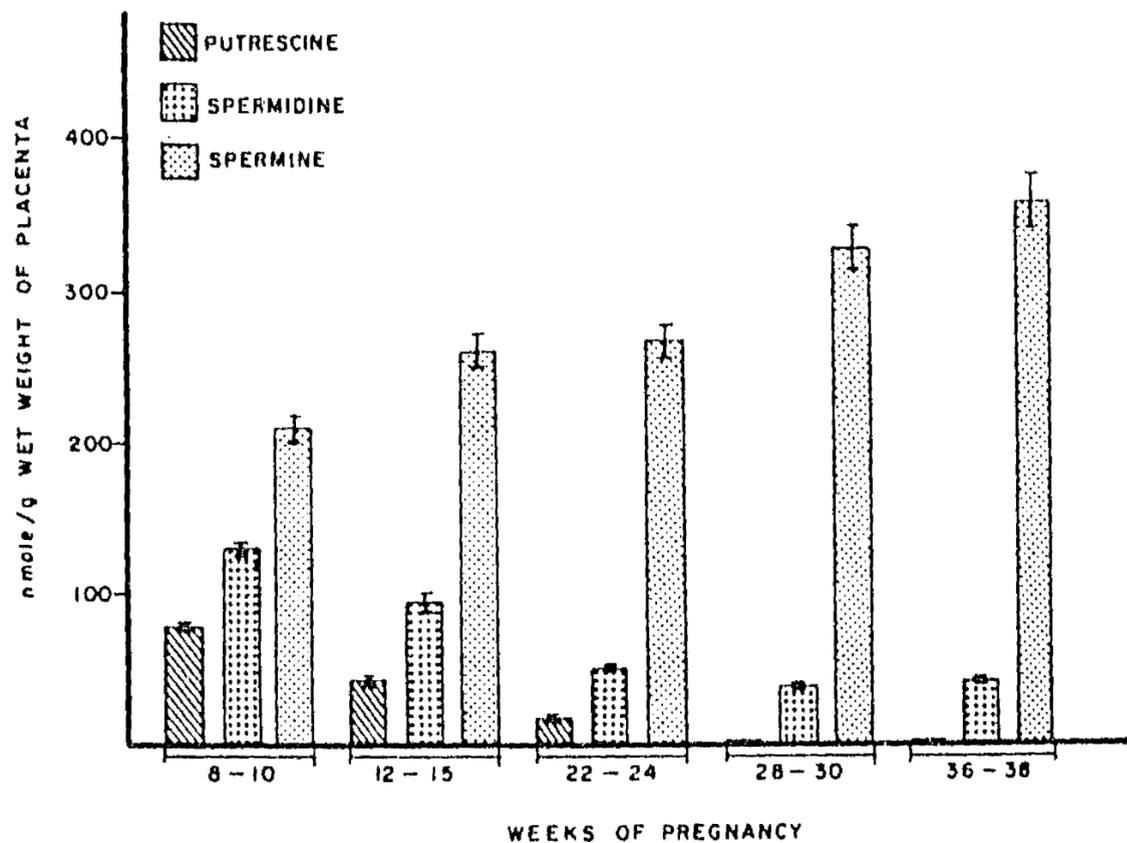


FIGURE 1. Polyamine pattern in human placenta during pregnancy. (From Porta, R., Servillo, L., Abbruzzese, A., and Della Pietra, G., *Biochem. Med.*, 19, 143, 1978.)

The increased synthesis of polyamines and their accumulation in human placenta may be related to the extensive protein synthesis required for growth and the production of protein hormones. These may be associated with early events in the development of the placenta and to its function in the later part of the pregnancy.<sup>27</sup>

Recent studies using physiological concentrations of polyamines indicated that these amines stimulate the phosphorylation of specific proteins in human placenta extracts.<sup>29</sup> The potency order of the three polyamines, spermine > spermidine > putrescine coincided with their levels in the placental tissues during gestation.<sup>28</sup> The spermine-induced phosphoproteins in human placenta are distinct from both cAMP and Ca-dependent phosphorylations. Spermine inhibits cAMP and Ca-dependent phosphorylation in the placenta. Polyamines may therefore act both directly by mediating phosphorylation by a polyamine-dependent reaction, or indirectly by inhibiting phosphorylation induced by other known inducers. These observations raise the possibility that polyamines or their metabolites are primary effectors for a specific cascade of events associated with pregnancy.<sup>29</sup>

### C. Amine Oxidases and Pregnancy

Enzymes involved in the oxidation of amines have long been associated with pregnancy. Thus diamine, spermidine, and polyamine oxidase activities showed a progressive increase in gestational age to 21 weeks, or beyond, declining to very low levels in the 3 to 4 days postpartum.<sup>30-33</sup> The placenta is usually regarded as the source of these enzymes, although some papers suggest that may be of decidual origin.<sup>34</sup> Several attempts have been made to purify and characterize the placental amine oxidases and determine their substrate specificity.<sup>35,36</sup> It was observed that both a mono- and diamine oxidase from placental homogenates oxidized several amines, although the affinity of enzyme for substrate varied considerably. Thus, it is believed that there is a wide group of catalytic proteins capable of oxidizing amines, and another which uses polyamines or their acetylated derivatives as substrates.

Morgan<sup>37</sup> has proposed that this apparent lack of specificity may be a consequence of the lack of data on the conditions in which these enzymes function *in vivo*, leading to confusion upon the definition and classification of amine oxidases in the literature. Amine oxidases have been classified according to their prosthetic groups in two classes: monoamine oxidases or flavin adenine dinucleotide-amine oxidases (FAD-AO) and the copper-amine oxidases (Cu-AO) or diamine oxidases.<sup>38</sup> The term polyamine oxidase was employed to describe amine oxidases able to catalyze oxidative deamination of spermidine and spermine regardless of enzymes acting on mono- or diamines as substrates.<sup>36, 39</sup>

In human pregnancy, diamine oxidase which oxidizes both histamine and putrescine circulates in maternal serum. Its levels rise during the progress of pregnancy. This enzyme originally was named histaminase as it used histamine as substrate. Later it was named diamine oxidase due to its activity on putrescine.<sup>40</sup>

In other investigations, Gahl and Pitot<sup>41</sup> demonstrated that the enzyme obtained and partially purified from human pregnancy serum has affinity for putrescine and spermidine, and it acted on a wide range of substrates of which N<sup>1</sup>-acetylspermidine was the best. This suggests that N<sup>1</sup>-acetylspermidine constitutes an important metabolite in human pregnancy because this molecule may be recycled to maintain the polyamine pool. Moreover, amine oxidase could participate in the conversion of products that might be toxic for the organism, as it has been proposed for the polyamine oxidase from rat liver, which also uses N<sup>1</sup>-acetylspermidine as substrate.

Gahl et al.<sup>42</sup> also reported the presence of spermidine oxidase in serum of pregnant women. They used labeled spermidine as substrate and separated the reaction products by ion-exchange chromatography. They determined some kinetic constants which were similar to those of diamine oxidase.

The activity of human serum spermidine oxidase can be detected during pregnancy as early as 8 weeks after the last menstrual cycle and increase with gestational age parallel to the increase in the amine oxidase activity, reaching a plateau at 20 weeks of gestation. On the other hand, spermine oxidase activity has been detected in maternal serum at the 10th week of gestation. This suggests that it may be the same enzyme, the polyamine oxidase.<sup>33</sup>

Polyamine oxidase activity has also been measured in amniotic fluid and in fetal membranes between 15 and 40 weeks of gestation.<sup>42</sup> Enzyme activity increased as pregnancy progressed, similar to that found in maternal serum, although the levels were lower (Figure 2). Fetal membranes, corion and amnion, also showed the presence of enzyme activity, with lower levels compared with those of decidua, but significantly higher than those found in placenta. This suggested that the enzyme found in amniotic fluid might be the consequence of a diffusion from the decidua through the membranes.<sup>43</sup>

#### D. Polyamine Oxidase and Abortion

Polyamine oxidase activity is highest in the intervillous circulation where the first and closest contact between fetal and maternal surfaces takes place.<sup>43, 44</sup> This led to the hypothesis that polyamine oxidase has a protective function in the physiology of pregnancy and that amine oxidase at elevated levels protects mother and fetus from biogenic amines at high concentrations. Another alternative hypothesis arose from the suggestion that the placenta liberates an immunosuppressive factor which "switches off" potentially harmful maternal lymphocytes.<sup>45</sup> Some studies *in vitro* have shown that the action of polyamine oxidase on polyamines yields nontoxic compounds which are inhibitors of cell proliferation.

Human pregnancy serum also inhibits lymphocyte proliferation *in vitro* in the presence of added spermine,<sup>44</sup> the effect being proportional to the polyamine oxidase content.<sup>45</sup> Several observations, such as the suppressive effects of polyamines spermidine and spermine on components of the immune system *in vitro* and the observation that the placenta is rich in spermine and in polyamine oxidase activity in retroplacental blood, suggest that products

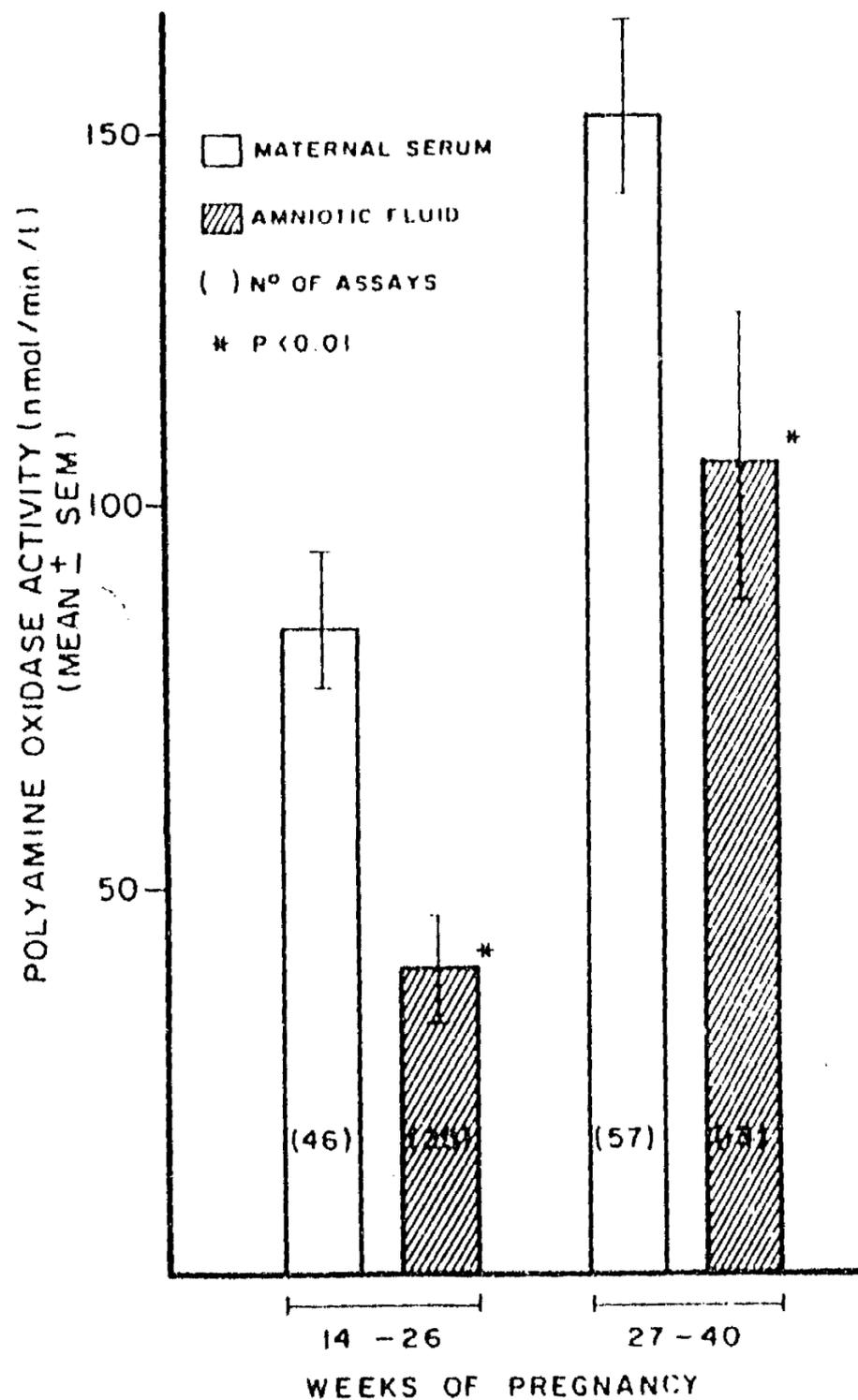


FIGURE 2 Polyamine oxidase activity in amniotic fluid and maternal serum in the second and third trimester of normal pregnancy (From Illei, G. and Morgan, D. M. L., *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 87, 413, 1980)

of the interaction of polyamines and polyamine oxidase contribute to the protection of fetus against maternal immune rejection because of the possible involvement of immunological factors in recurrent and spontaneous abortion.<sup>46,47</sup>

Illei and Morgan<sup>48</sup> studied a group of patients who aborted spontaneously between 11 and 22 weeks of pregnancy. The results of this investigation indicated that serum polyamine oxidase activity was significantly lower in patients with spontaneous abortion than the control group (Figure 3). Although these authors pointed out that the low levels of this enzyme

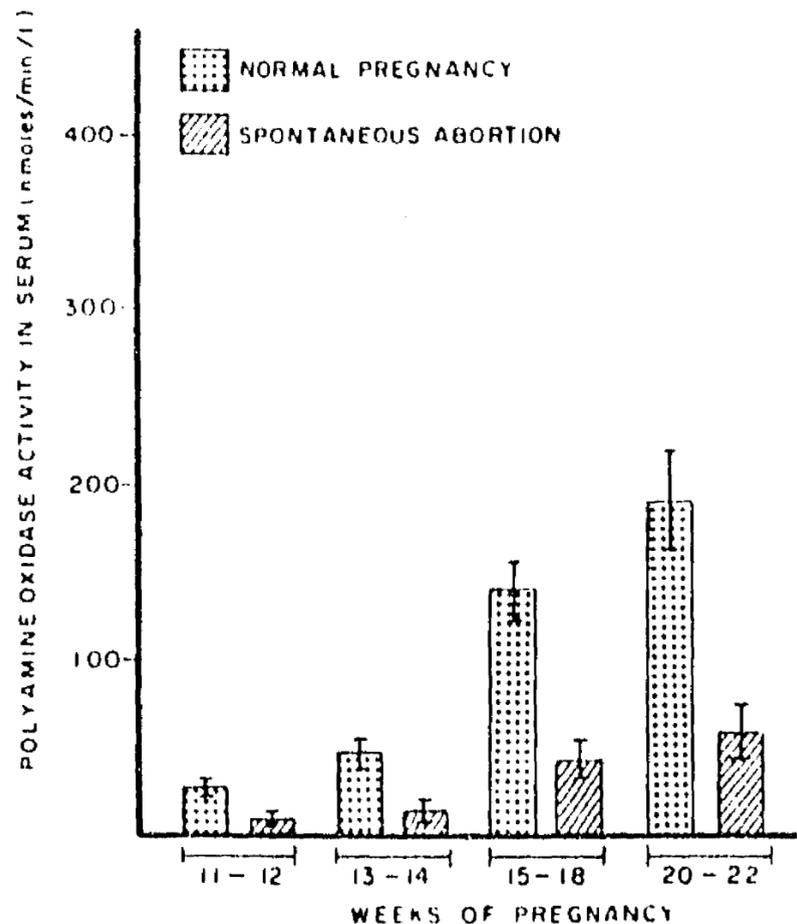


FIGURE 3—Polyamine oxidase activity in serum during normal pregnancy and spontaneous abortion. (From Iller, G. and Morgan, D. M. L., *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 89, 199, 1982.)

found in women that had an abortion were not necessarily linked to each other, this suggests that certain levels of polyamines-polyamine oxidase interaction may play an important role in the maintenance of normal pregnancy by protecting the fetus from maternal rejection, thus participating in the embryonic growth. Other evidence<sup>49</sup> also supports the notion that malfunction of a localized immunological barrier may be related to reduced amine oxidase activity and may lead to spontaneous abortion.<sup>17</sup>

#### E. Preeclampsia

Preeclampsia, also named gestosis or toxemia, usually appears in the woman after the 20th week of pregnancy. In some cases it appears in the first 24 hr postpartum.<sup>50</sup> Although the etiology of preeclampsia is unknown, its pathophysiology and impact produced in target organs are well defined.<sup>51</sup> Toxemic patients show hypertension concomitant with severe alterations in vascular structure, proteinuria, and edema. In complicated cases convulsions and coma are found. Several pathological manifestations have been associated with this syndrome, such as low platelet count, alterations in coagulation mechanisms, increased plasma viscosity, elevated levels of immunoglobulin G, and rheumatoid factor.<sup>52</sup> Furthermore, changes in nucleic acid and protein levels have been observed in placentae.<sup>53</sup>

In uterine veins of toxemic women trophoblast levels are 20-fold higher compared with those found in normal pregnant women. This may induce a challenge of the immunologic response of the mother vs. the fetus. It was also demonstrated that migration of macrophages may be inhibited by toxemic microsomal fractions of placental origin.<sup>54</sup>

It has been well established that polyamines may modify the structure and function of nucleic acids. Thus, alterations in polyamine metabolism may result in an abnormal synthesis

**Table 2**  
**POLYAMINE OXIDASE IN PREGNANCY**  
**SERUM OF NORMAL AND TOXEMIC WOMEN**

Women	Polyamine oxidase activity (picomoles of $\Delta^1$ -pyrroline per milligram of protein per hour)
Normal (n = 20)	6.91 $\pm$ 2.53
Toxemic (n = 20)	8.48 $\pm$ 3.32

*Note.* Values are mean  $\pm$  SD and n = number of women.

of proteins and other molecules, such as blood circulating in an immune complex way. In preeclamptic women, the permeability of cellular membranes is altered, causing a protein leak out to the urine. This process may be regulated by polyamines.<sup>55,56</sup>

During normal pregnancy, polyamine oxidase increases together with spermine, while the concentrations of putrescine and spermidine are reduced. It is possible that spermidine binds to enzyme to produce the complex polyamine oxidase-polyamine which exerts an inhibitory effect regulating the placental growth and limiting their extension to avoid the myometrium invasion. In toxemic women, the myometrial vessels show swelling in the intima layer and hyperplasia in the muscular layer;<sup>50</sup> by this reason an abnormality in the trophoblast invasion is suspected.<sup>37</sup> These changes in spiral vessels insure the intervillous irrigation-provoking vasoconstriction that rises the pressure and increases the vascular permeability, in addition to causing an abnormal interaction between platelet and vessel endothelium.

To gain a better understanding of the correlation between polyamine metabolism and preeclampsia, the activity of serum polyamine oxidase was determined in preeclamptic patients. These patients, who were selected by their arterial pressure of 160/110 mm Hg or higher, maintained for a time of 6 hr associated to edema extended to abdomen or generalized, and proteinuria higher than 3.0 g/l.<sup>57</sup> The symptoms were diagnosed only after the 35th week of reliable amenorrhea, and the cases of toxemia postpartum were excluded. The control group consisted of women with normal pregnancy. The values for polyamine oxidase activity obtained in preeclamptic patients showed no significant differences compared with the control group (Table 2). It is however recommended that the activity of the enzyme should be measured from the first trimester of pregnancy to determine whether the enzyme undergoes early significant changes.

Between weeks 39 and 41 (65%) and week 43 (5%) high incidences of toxemia cases were found, while in women with normal pregnancy it was uniformly distributed along the third trimester (Figure 4). This observation suggests that weeks 39 to 41 are the critical weeks of pregnancy in which toxemia appears.

#### *1. Perspectives on the Inhibition of Uterine Ornithine Decarboxylase Activity*

The essential roles of polyamines in normal and neoplastic growth in culture and in animal tissues led to the development of specific inhibitors of polyamine synthesis.<sup>10,13</sup> Until very recently the biosynthesis and hence the tissue concentrations of polyamines were not significantly inhibited by those drugs. However, with the synthesis of DFMO,<sup>8</sup> the situation changed dramatically. This compound irreversibly and specifically inhibits ODC (LD<sub>50</sub> mice and rats: PO 5 g/kg, IP 3 g/kg). It is capable of depleting cellular polyamine concentrations *in vivo*.<sup>58-60</sup> DFMO has been used extensively to explore the biological roles of polyamines in a variety of physiological and pathological processes. It has been logical, therefore, to explore the physiological significance of the polyamines, using DFMO in systems exhibiting rapid cell growth and differentiation.

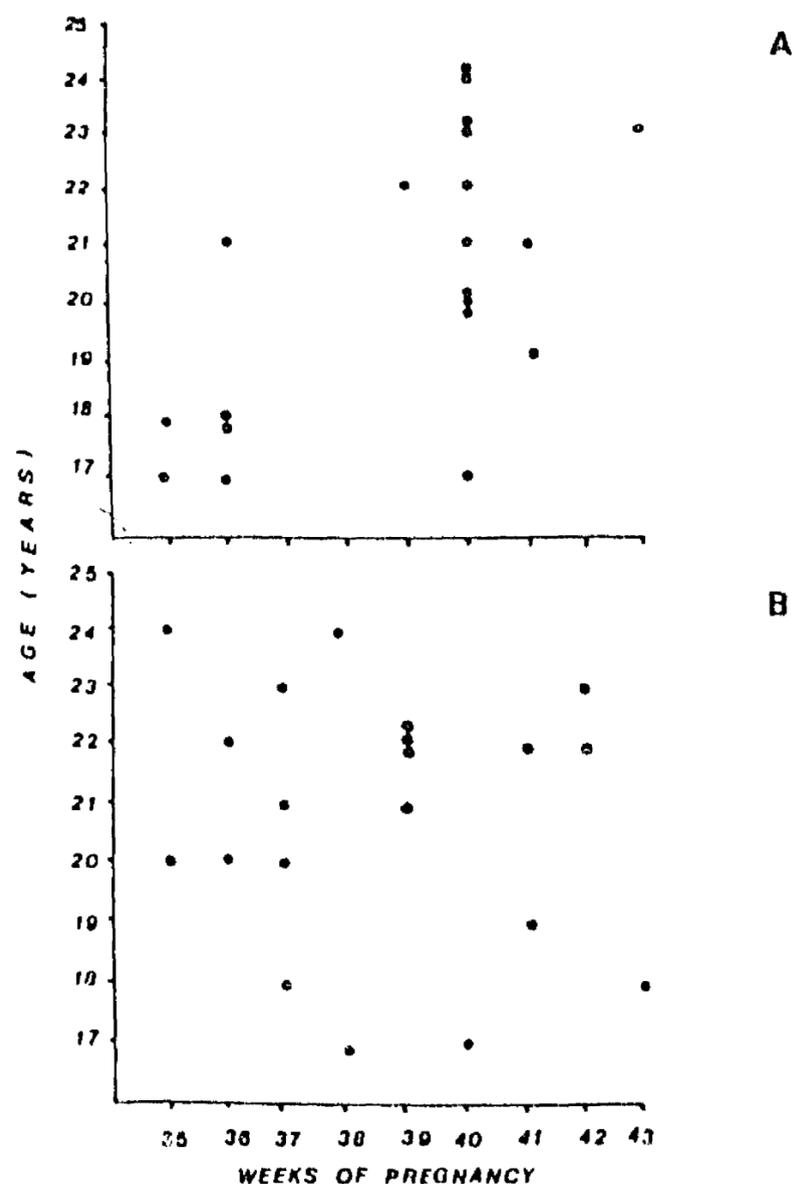


FIGURE 4. Between weeks 39 and 41 high incidences (65%) of toxemia cases were found (A). In women with normal pregnancy it was uniformly distributed along the third trimester (B).

Early mammalian embryogenesis represents one of the most actively dividing and differentiating cell systems, and numerous studies have described a substantial increase in ODC activity associated with this process.<sup>2</sup> In the mouse uterus, ODC activity begins to increase shortly after nidation and reaches a peak on day 8 of gestation. During this time, putrescine and spermidine concentrations also increase, but spermine levels are hardly affected. The peak of the biochemical changes corresponds to the sudden increase in embryonic growth. This is associated with early somite formation which in the mouse takes place on days 7 to 8. The effects of treatment with DFMO during days 5 to 8 of gestation were unequivocal; the increase in ODC activity and putrescine and spermidine concentrations was abolished and embryonic development failed to progress beyond day 7. The arrested embryo was subsequently resorbed or lost from the uterus.<sup>2,61</sup> These effects of DFMO can be completely reversed by the simultaneous administration of putrescine whose half-life is relatively long,<sup>62</sup> implicating inhibition of putrescine biosynthesis as the mechanism of the counter-gestational effect. DFMO also inhibits early embryonic development in rats when administered in pre- and postimplantation period<sup>2, 18, 19</sup> and in rabbits during postimplantation period.<sup>2</sup> Thus, an

increase in ODC activity leading to a rapid rise in putrescine concentration appears to be absolutely essential during a critical period after implantation for continued mammalian embryonal growth.

On this basis, DFMO has also been proposed as a postcoitally effective antifertility agent in females,<sup>18</sup> which provides a new research area in contraception.

On the other hand, several studies have been carried out on inhibition of tumor growth by DFMO.<sup>63,64</sup> The therapeutic value obtained with experimental animals can be applied clinically, since altered polyamine levels may be involved in malignant tissue transformation.<sup>65</sup> For example, it has been reported that in endometrial carcinoma, polyamine levels are higher than in normal endometrium.<sup>21</sup>

### III. PHYSIOLOGY OF POLYAMINES IN THE MALE REPRODUCTIVE SYSTEM

Research on physiological roles of polyamines related with the male reproductive tract has been discussed in numerous papers. Most of the information obtained comes from laboratory experiments with animals. In the reproductive systems of men the presence of polyamines has attracted the attention of many investigators, who have studied particularly the polyamine metabolism in prostate, semen, and testis. Recently, polyamines have been associated with capacitation and fertilization processes.

#### A. Testis

Susuki et al.<sup>66</sup> determined the activity of polyamine oxidase in several human organs. It was highest in the liver, followed by the testis ( $339 \pm 80$  nmol/g wet weight per 30 min). High activity in testis may be related to the process of spermatogenesis.<sup>67</sup>

#### B. Prostate

In man and in some other mammals, seminal spermine is derived from the prostate gland.<sup>68</sup> Analysis of polyamines in whole prostatic tissue from sexually mature animals revealed that large amounts of spermidine and spermine are present in the prostate.<sup>69</sup> Other observations indicate that various lobes of prostate gland of rabbit, mouse, guinea pig, and dog exhibit spermidine and spermine contents that fall within the range found in most other nongenital tissues. Ventral and dorsolateral lobes of the rat prostate are indeed depositories of large amounts of spermidine and spermine, similar to those found in human prostate.<sup>70</sup>

The enzymes involved in polyamine biosynthesis, ODC,<sup>71</sup> SAMD,<sup>72</sup> spermidine synthase, and spermine synthase have been purified from rat prostate,<sup>73</sup> and to some extent from human prostate (particularly SAMD).<sup>74</sup>

#### C. Semen

Normal human semen contains spermine in concentrations of 5 to 15 mM,<sup>68,75</sup> and smaller amounts of spermidine are present in human seminal fluid,<sup>75</sup> which also contains low but readily detectable quantities of putrescine and 1,3-diaminopropane. The molar ratio of spermine to spermidine in human semen is greater than 12.<sup>21</sup>

The fact that the concentration of spermine in human semen is much higher than in any other tissues and body fluid, led to various speculations as to their physiological role. It was found that spermine does not affect the motility of human and bovine sperm *in vitro*.<sup>76</sup> Other reports indicated that spermine has neither a beneficial nor a deleterious effect on the motility or metabolism of mammalian spermatozoa when added *in vitro*.<sup>68</sup> On the other hand, some investigators reported that spermine activates the motility of human and rabbit spermatozoa.<sup>77,78</sup> Evidence has been obtained by *in vitro* studies that spermine also enhances the activity of seminal maltase, which is involved in the degradation of glycogen, and which increases glucose utilization by sperm, at the same time reducing fructose utilization.<sup>77</sup>

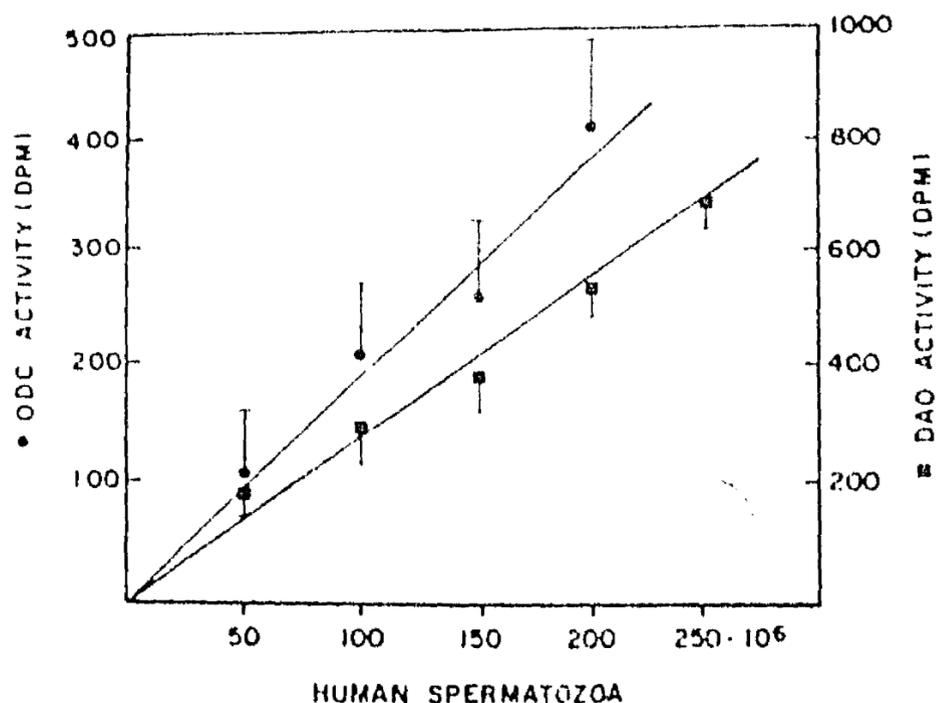


FIGURE 5. Ornithine decarboxylase (ODC) and diamine oxidase (DAO) activities at different concentrations of human spermatozoa.

Addition of physiological amounts of spermine to spermatozoal suspensions caused a significant increase in cAMP levels,<sup>22</sup> a nucleotide that induces capacitation in human spermatozoa.<sup>23</sup> The effect of spermine on cAMP levels may be explained by the fact that this polyamine inhibits phosphodiesterase activity of cAMP, besides activating adenylate cyclase activity.<sup>20</sup>

It has also been observed that the effect of spermine on cAMP levels could be further enhanced by prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), and has been demonstrated that PGE<sub>2</sub> produces stimulation of ODC activity.<sup>81</sup>

#### *1. Correlation of Seminal Polyamine and Metabolizing Enzyme Levels with Sperm Count and Motility*

Some attempts have been made to elucidate a physiological or pathological role of spermine and its metabolic enzymes by studying the correlation between polyamine concentrations in the human seminal plasma and sperm count and motility. A significant correlation between the spermine concentration of human seminal plasma and the total sperm count in the same semen specimens was noted,<sup>82</sup> although this correlation was not confirmed.<sup>83</sup>

A complex type of correlation between ODC, SAMD,<sup>84</sup> and diamine oxidase activities and sperm count has also been observed.<sup>85</sup> The enzyme activities were high in semen samples with sperm counts of less than 30 million per milliliter and those samples in which the sperm count exceeded 60 million per milliliter, and low in samples having sperm counts between 30 to 60 million per milliliter.

Some samples showing poor initial sperm motility have been found to contain high diamine oxidase activity and low spermine content.<sup>85</sup> A positive correlation between the spermine content of seminal plasma and motility has also been noted.<sup>82</sup> These observations led to the speculation that the spermine in semen might have a physiological role with respect to spermatozoa via its oxidized derivatives, which have a high affinity for sperm.<sup>86</sup> It has been observed that human seminal plasma and sperm contain both ODC and diamine oxidase activities<sup>81,87</sup> (Figure 5). The latter is capable of oxidizing polyamines and might produce alterations in quantitative determination of polyamines.<sup>88</sup> The possibility that the spermine

normally present in human semen might be oxidized by enzymes to aldehyde products that are known to be toxic for a variety of eukaryotic cells,<sup>12</sup> including human sperm,<sup>69</sup> might be important for the metabolism survival and fertilizing capacity of postejaculatory sperm. Recent studies indicated that polyamines stimulate the acrosome reaction in guinea pig.<sup>70</sup>

#### 2. *Inhibition of Human Spermatozoa Ornithine Decarboxylase and its Effect on In Vitro Fertilization*

Experiments on fertilization were carried out in Biggers medium (pH 7.4) containing 0.2% bovine serum albumin and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, incubated at 37°C. Of 40 oocytes, 2 fractions obtained from adult hamsters superovulated with gonadotropin were incubated in presence of 1.6 million per milliliter of untreated spermatozoa (control) or with preincubated spermatozoa in presence of 100 µg DFMO. Fertilization was studied at 2, 4, and 8 hr. ODC of treated spermatozoa was inhibited by approximately 75% within 30 min.<sup>71</sup> Fertilization results indicated a formation of male pronucleus fourfold higher in the case of fertilized oocytes with treated spermatozoa. Motility and affinity of the spermatozoa to oocyte was not modified by this treatment. These results suggest that ODC and/or the generated products of its action might have a regulatory role on postfertilization processes.

### IV. URINARY POLYAMINES IN PROSTATE CANCER

Carcinoma of the prostate is considered a cause of high incidence of mortality. Some biochemical markers have been used for their early detection and treatment.<sup>72</sup>

Of particular interest is the fact that the highest concentrations of polyamines found in the human body occur in the prostate.<sup>68</sup> This observation, plus reports of elevated urinary polyamines in some patients with far advanced malignancies of other organ systems,<sup>73</sup> led to investigation of the relationship between prostate carcinoma and urinary excretion of polyamines.

In early studies, Fair et al.<sup>74</sup> observed that patients with prostatic cancer excrete more spermidine than normal controls. The increase in spermidine excretion noted in those patients with more undifferentiated neoplasms was interesting. Of the 34 urine specimens from patients with grade II or higher cancer, 30 had elevated spermidine levels. This finding was in contrast with the observation that only one of ten urine specimens in patients with grade I histologic changes showed increased spermidine levels. These results tend to indicate that a grade I carcinoma appears to be a more slowly growing lesion and, hence, might be expected to have less biochemical activity, such as ribonucleic acid synthesis and polyamine production, than grade III or IV lesions.

In other patients, the elevated spermidine values found in three of four patients with a single prostatic nodule indicate that polyamine levels may be of value as a test for detecting prostatic malignancy at a potentially curable stage.

As a screening test for prostatic carcinoma, urine represents an obvious advantage because it is readily obtained without involving physician time.<sup>75</sup>

### V. POLYAMINES IN PROSTATITIS TREATMENT

The high content of polyamines in the human prostatic hyperplasia was shown early by Duzendorfer and Russell.<sup>76</sup> Subsequently it has been reported that DFMO decreases the normal weight gain of the ventral prostate and seminal vesicles of growing rats and blocks the testosterone induced regrowth of ventral prostate in castrated rats.<sup>75</sup> The inhibition of ODC by DFMO was studied in patients with chronic nonsuppurative prostatitis.<sup>76</sup> Partial clinical response and remission of gross hematospermia was evident after 18 g day of DFMO, when administered orally for 1 month. During the DFMO treatment period, a substantial

decrease in prostate size was noticed. In two out of ten patients, a 16% reduction of hematocrit and hemoglobin was reported. This was reversed 2 months after stopping the therapy.<sup>10</sup>

Administration of DFMO in the drinking water (20 g/l) to adult rats for 3 days led to marked changes in polyamine metabolism in ventral prostate.<sup>11</sup> A 90% inhibition of ODC activity is accompanied by an approximately 80% reduction of the concentration of putrescine and spermidine and by a 36% decrease in spermine. These observations may partly explain the mechanism of DFMO in human-treated prostatitis.

## VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

It is evident that polyamines participate in normal and pathological processes. Their highest levels are found in those tissues with increased metabolic activity. The presence and participation of polyamines in human reproductive systems have been well established, and it is known that both physiological and biochemical processes are regulated by polyamines.

1. The endometrium which undergoes continuous morphological and functional changes contains ODC at high activities.
2. Polyamines stimulate the phosphorylation of specific proteins in the placenta.
3. Polyamines apparently have a protective function in physiology of pregnancy.
4. Polyamines participate in other situations such as preeclampsia patients.
5. The selective inhibition of polyamine biosynthesis in early pregnancy may have practical applications, also as the treatment of malignancies of the reproductive organs.

## REFERENCES

1. Pegg, A. E. and McCann, P. P., Polyamine metabolism and function, *Am. J. Physiol.*, **243**, C 212, 1982.
2. Fozard, J. R., Part, M. L., Prakash, N. J., Grove, J., Schechter, P. J., Sjoerdsma, A., and Koch-Weser, J., Ornithine decarboxylase: an essential role in early mammalian embryogenesis, *Science*, **208**, 505, 1980.
3. McCornick, F., Polyamine metabolism in enucleated mouse L-cells, *J. Cell Physiol.*, **93**, 285, 1977.
4. Murphy, B. J. and Brosman, M. E., Subcellular localization of ornithine decarboxylase in liver of control and growth-hormone treated rats, *Biochem. J.*, **157**, 33, 1976.
5. Ono, M., Inoue, H., Suzuki, F., and Takeda, Y., Studies on ornithine decarboxylase from the liver of thioacetamide treated rats. Purification and some properties, *Biochim. Biophys. Acta*, **284**, 285, 1972.
6. Pegg, A. E. and Williams-Ashman, H. G., Biosynthesis of putrescine in the prostate gland of the rat, *Biochem. J.*, **108**, 533, 1968.
7. Amar, V. J. and Kuehn, G. D., Phosphorylation of ornithine decarboxylase by a polyamine-dependent protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 5518, 1981.
8. Metcalf, B. N., Bey, P., Danzin, C., Jung, M. J., Casara, P., and Vevert, J. P., Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C. 4.1.1.17) by substrate and product analogs, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 2551, 1978.
9. Emanuelsson, H. and Heby, O., Nuclear ornithine decarboxylase. Electron microscope autoradiographic identification of the active enzyme using  $\alpha$ -[5-<sup>3</sup>H] difluoromethylornithine, *Eur. J. Cell Biol.*, **30**, 288, 1981.
10. Heby, O. and Andersson, G., Polyamines and the cell cycle, in *Polyamines in Biomedical Research*, Gargas, J. M., Ed., John Wiley & Sons, New York, 1980, 17.
11. Heby, O., Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation, *Differentiation*, **14**, 11, 1981.
12. Bachrach, U., *Functions of Naturally Occurring Polyamines*, Academic Press, New York, 1973.
13. Jane, J., Posso, H., and Raina, A., Polyamines in rapid growth and cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, **473**, 241, 1978.

14. Hopkins, D. and Manchester, K. L., Polyamines: molecules in search of a role?, *South Afr. J. Sci.*, 78, 25, 1982.
15. Tabor, C. W. and Tabor, H., Polyamines, *Annu. Rev. Biochem.*, 53, 749, 1984.
16. Hölttä, E., Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: purification and properties of polyamine oxidase, *Biochemistry*, 16, 91, 1977.
17. Pegg, A. E. and Williams-Ashman, H. G., Biosynthesis of putrescine, in *Polyamines in Biology and Medicine*, Morris, D. R. and Marton, L. J., Eds., Marcel Dekker, New York, 1981, 3.
18. Reddy, P. R. K. and Rukundl, V.,  $\alpha$ -Difluoromethylornithine as a postcoitally effective antifertility agent in female rats, *Contraception*, 24(2), 215, 1981.
19. Méndez, J. D., Díaz-Flores, M., Durán, G., and Hicks, J. J., Inhibition of rat embryonic development by the intrauterine administration of  $\alpha$ -difluoromethylornithine, *Contraception*, 28(1), 93, 1983.
20. Williams-Ashman, H. G., Pegg, A. E., and Lockwood, D. H., Mechanisms and regulation of polyamine and putrescine biosynthesis in male genital glands and other tissues of mammals, in *Advances in Enzyme Regulation*, Vol. 7, Weber, G., Ed., Pergamon Press, London, 1969, 291.
21. Williams-Ashman, H. G. and Lockwood, D. H., Role of polyamines in reproductive physiology and sex hormone action, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 171, 882, 1970.
22. Shet, A. R. and Moodbidri, S. B., Significance of polyamines in reproduction, *Adv. Sex Horm. Res.*, 3, 51, 1977.
23. Romano, M., Cecco, L., Santacrose, M. A., Cerra, M., Rasquinelli, R., Pagnano, A. M., and Paladini, A., Polyamine levels and ODC activity in the normal human endometrium and myometrium, in the myoma and the endometrial carcinoma, in *Advances in Polyamines in Biomedical Sciences*, Calderera, C. M. and Bachrach, U., Eds., CLUEB, Bologna, Italy, 1984, 145.
24. Osterberg, S., Rose, S., and Heby, O., Urinary polyamine excretion during the menstrual cycle, *Clin. Chem.*, 24(5), 769, 1978.
25. Heby, O. and Andersson, G., Tumor cell death: the probable cause of increased polyamine levels in physiological fluids, *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A*, 86, 17, 1978.
26. Russell, D. H., Giles, H. R., Christian, C. D., and Campbell, J. L., Polyamines in amniotic fluid, plasma, and urine during normal pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 132, 649, 1978.
27. Hirunatsu, Y., Eguchi, K., Yonezaw, M., Hiyase, R., and Sekiba, K., Alteration of red blood cells polyamines during pregnancy and neonatal period, *Biol. Neonate*, 40, 136, 1981.
28. Porta, R., Servillo, L., Abbruzzese, A., and Della Pietra, G., Automated chromatographic analysis of human placenta polyamines, *Biochem. Med.*, 19, 143, 1978.
29. Moore, J. J., Cardaman, R. C., and Lundgren, D. W., Spermine-enhanced protein phosphorylation in human placenta, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 176, 313, 1984.
30. Swanberg, H., Histaminase in pregnancy, *Acta Physiol. Scand.*, 23 (Suppl. 79), 1, 1950.
31. Southren, A. L., Kobayashi, Y., Carmody, N. C., and Weingold, A. B., Serial measurements of plasma diamine oxidase during normal human pregnancy by an improved method, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 95, 615, 1966.
32. Gahl, W. A., Vale, A. M., and Pitot, H. C., Spermidine oxidase in human pregnancy serum: probable identity with diamine oxidase, *Biochem. J.*, 201, 161, 1982.
33. Illei, G. and Morgan, D. M. L., Polyamine oxidase activity in human pregnancy serum, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 86, 878, 1979.
34. Illei, G. and Morgan, D. M. L., The distribution of polyamine oxidase activity in the fetomaternal compartments, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 86, 873, 1979.
35. Bardsley, W. G., Crabbe, M. J. C., and Scott, I. V., The amine oxidase of human placenta and pregnancy plasma, *Biochem. J.*, 139, 169, 1974.
36. Amicosante, G., Oratore, A., Crito, C., and Finazzi Agro, A., Rapid characterization and partial purification of various animal amine oxidases, *Experientia*, 40, 1140, 1984.
37. Morgan, D. M. L., Commentary: amine oxidases and pregnancy, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 89, 127, 1982.
38. Mondovi, B., Guerrieri, P., Costa, M. T., and Sabatini, S., Amine oxidase inhibitors and biogenic amines metabolism, in *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Calderera, C. M., Zappia, V., and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 75.
39. Morgan, D. M. L., Polyamine oxidase and cellular interactions, in *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Calderera, C. M., Zappia, V., and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 1981, 65.
40. Andersson, A. C., Henningsson, S., and Rosengren, E., Diamine oxidase, in *Polyamines in Biomedical Research*, Gaugas, J. M., Ed., John Wiley & Sons, Chichester, England, 1980, 273.
41. Gahl, W. A. and Pitot, C., Acetylated polyamines as substrates for human pregnancy serum diamine oxidase, *Life Sci.*, 29 (21), 2177, 1981.
42. Illei, G. and Morgan, D. M. L., Polyamine oxidase activity in amniotic fluid and fetal membranes, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 87, 413, 1980.

- 43 Klopffer, A. and Hughes, G., Placental secretion of oestrogens and protein hormones, *Arch. Gynäkol.*, 225, 171, 1978.
- 44 Gaugas, J. M. and Cursen, P., Polyamine interaction with pregnancy serum in suppression of lymphocyte transformation, *Lancet*, i, 18, 1978.
- 45 Morgan, D. M. L. and Hlei, G., Polyamine polyamine oxidase interaction: part of maternal protective mechanism against fetal rejection, *Br. Med. J.*, 280, 1295, 1980.
- 46 Bresnihan, B., Grogor, R. R., Oliver, M., Lewkonja, R. M., Hughes, G. R. V., Lovins, R. E., and Faulk, W. P., Immunological mechanism for spontaneous abortion in systemic lupus erythematosus, *Lancet*, ii, 1205, 1977.
- 47 Taylor, C. and Faulk, W. P., Prevention of recurrent abortion with leucocyte transfusions, *Lancet*, ii, 68, 1981.
- 48 Hlei, G. and Morgan, D. M. L., Serum polyamine oxidase activity in spontaneous abortion, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 89, 199, 1982.
- 49 Labili, R. S. and Tomasi, T. B., Enzymatic oxidation of polyamines relationship to immunosuppressive properties, *Eur. J. Immunol.*, 11, 266, 1981.
- 50 Lopez-Ilera, M., Fisiología patológica de la toxemia del embarazo, in "La toxemia del embarazo", *Temas de Ecología 1977*, Publicación particular limitada, Mexico, 1978, 1.
- 51 De Voe, S. J. and O'Slaughnessy, R., Clinical manifestations and diagnosis of pregnancy-induced hypertension, *Clin. Obstet. Gynecol.*, 27(4), 836, 1984.
- 52 Mathews, J. D. and Mason, T. W., Plasma viscosity and pre eclampsia, *Lancet*, 8, 409, 1974.
- 53 Samur, M. B., Ibrahim, F. K., Fattah, M. M. A., and Ramadan, M. A., Nucleic acids and protein changes in normal and pre-eclamptic placentae, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 58, 535, 1979.
- 54 Toder, V., Eichenbrenner, I., Amit, S., Serr, D., and Nebel, I., Cellular hyperreactivity to placenta in toxemia of pregnancy, *Eur. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol.*, 9(6), 535, 1979.
- 55 Koenig, H., Goldstone, A., and Lu, Ch. Y., Polyamines regulate calcium fluxes in a rapid plasma membrane response, *Nature*, 305(5934), 530, 1983.
- 56 Elgavish, A., Wallace, R. W., Pillion, D. J., and Meezan, E., Polyamines stimulate D-glucose transport in isolated renal brush border membrane vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, 777, 1, 1984.
- 57 Mendez, J. D., Espinoza, L. M., Arratia, C., and Hicks, J. E., unpublished data.
- 58 Mamont, 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., Ed., John Wiley & Sons, Chichester, England, 1980, 147.
- 59 Fozard, J. R., Puri, M. L., Prakash, N. J., and Grove, J., Inhibition of murine embryonic development by  $\alpha$ -difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, *Eur. J. Pharmacol.*, 60, 379, 1980.
- 60 Slotkin, T. A., Scidler, F. J., Trepanier, P. A., Withmore, W. L., Larea, L., Barnes, G. A., Weigel, S. J., and Bartolome, J., Ornithine decarboxylase and polyamines in tissues of neonatal rat: effects of  $\alpha$ -difluoromethylornithine, a specific irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, *J. Pharmacol. Ther.*, 222(2), 741, 1982.
- 61 Fozard, J. R. and Koch-Weser, J., Pharmacological consequences of inhibition of polyamine biosynthesis with  $\alpha$ -difluoromethyl ornithine, *Trends Pharmacol. Sci.*, 3(3), 107, 1982.
- 62 Barkai, U. and Kraicer, P. F., Definition of period of induction deciduoma in the rat using ornithine decarboxylase as a marker of growth onset, *Int. J. Fertil.*, 23(2), 106, 1978.
- 63 Prakash, N. J., Schechter, P. J., Grove, J., and Koch-Weser, J., Effect of  $\alpha$ -difluoromethylornithine, an enzyme activated irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, on L1210 leukemia in mice, *Cancer Res.*, 38, 3059, 1978.
- 64 Prakash, N. J., Schechter, P. J., Mamont, P. J., Grove, J., Koch-Weser, J., and Sjoerdsma, A., Inhibition of EM1G tumor growth by interference with polyamine biosynthesis; effects of  $\alpha$ -difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, *Life Sci.*, 26, 101, 1980.
- 65 Russell, D. H., Clinical relevance of polyamines, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 18(3), 261, 1983.
- 66 Suzuki, O., Matsumoto, T., and Katsumata, Y., Determination of polyamine oxidase activities in human tissue, *Experientia*, 40, 838, 1984.
- 67 Melchior, J. H. and Turkington, R. W., Hormonal regulation of spermidine formation during spermiogenesis in the rat, *Endocrinology*, 92, 595, 1973.
- 68 Mann, T., *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*, John Wiley & Sons, New York, 1964, 193.
- 69 Tabor, H. and Tabor, C. W., Spermidine, spermine, and related amines, *Pharmacol. Rev.*, 16, 245, 1964.
- 70 Rhodes, J. B. and Williams-Ashman, H. G., Observations on polyamines in male accessory glands of reproduction, *Med. Exp.*, 10, 281, 1964.
- 71 Jann, I. and Williams-Ashman, H. G., On the purification of L-ornithine decarboxylase from rat prostate and effect of thiol compounds on the enzyme, *J. Biol. Chem.*, 246, 1725, 1971.

72. Jänne, J. and Williams-Ashman, H. G., Dissociation of putrescine-activated decarboxylation of S-adenosyl-L-methionine from the enzymic synthesis of spermidine and spermine by purified prostatic enzyme preparations, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42, 222, 1971.
73. Jänne, J., Schenone, A., and Williams-Ashman, H. G., Separation of two proteins required for synthesis of spermidine from S-adenosyl-L-methionine and putrescine in rat prostate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42, 758, 1971.
74. Zappia, V., Cartent-Furlan, M., and Della Pietra, G., S-Adenosyl methionine decarboxylase from human prostate, *Biochem. J.*, 129, 703, 1972.
75. Huggins, C., The physiology of the prostate gland, *Physiol. Rev.*, 25, 281, 1945.
76. Redenz, E., Über die Wirkung des Spermiums auf die Bewegung der Spermatozoen, *Arch. Ges. Physiol.*, 216, 605, 1927.
77. Harrison, G. A., Spermine in human tissues, *Biochem. J.*, 25, 1855, 1931.
78. White, I. G., The effect of some seminal constituents and related substances on diluted mammalian spermatozoa, *Aust. J. Biol. Sci.*, 7, 379, 1954.
79. Hicks, J. J., Pedrón, N., and Rusado, A., Modifications of human spermatozoa motility by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens, and follicular fluid, *Fertil. Steril.*, 23(12): 886, 1972.
80. Shah, G. V. and Sheth, A. R., Inhibition of phosphodiesterase activity of human spermatozoa by spermine, *Experientia*, 34(8), 980, 1977.
81. Madhubala, R. and Redy, P. R. K., Stimulation of ornithine decarboxylase activity by prostaglandins in the isolated cells of immature rat testis, *FEBS. Lett.*, 122(2), 197, 1980.
82. Fair, W. R., Clark, R. B., and Welner, N., A correlation of seminal polyamine levels and semen analysis in the human, *Fertil. Steril.*, 23(1), 38, 1972.
83. Jänne, J., Hälttä, E., Haaranen, P., and Elfving, K., Polyamines and polyamine-metabolising enzyme activities in human semen, *Clin. Chim. Acta*, 48, 393, 1973.
84. Thakur, A. N., Sheth, A. R., and Rao, S. S., Polyamines in human semen: presence of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase, *Clin. Chim. Acta*, 55, 377, 1974.
85. Hälttä, E., Pulkkinen, P., Elfving, K., and Jänne, J., Oxidation of polyamines by diamine oxidase from human seminal plasma, *Biochem. J.*, 145, 373, 1975.
86. Pulkkinen, P., Kanerva, S., Elfving, K., and Jänne, J., Association of spermine and diamine oxidase activity with human spermatozoa, *J. Reprod. Fertil.*, 43, 49, 1975.
87. Méndez, J. D., unpublished data.
88. Leone, E., De Prisco, R., Annibalo, N., and La Montagna, R., Polyamines in human semen, in *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Calderera, C. M., Zappia, V., and Bachrach, U., Eds. Raven Press, New York, 1981, 473.
89. Fleming, A. P. and Armstrong, D. T., Effects of polyamines upon capacitation and fertilization in the guinea pig, *J. Exp. Zool.*, 233, 93, 1985.
90. Méndez, J. D., unpublished data.
91. Pontes, J. E., Biological markers in prostatic cancer, *J. Urol.*, 130, 1037, 1983.
92. Russell, D. H., Levy, C. C., Schimpff, S. C., and Hawk, I. A., Urinary polyamines in cancer patients, *Cancer Res.*, 31, 1555, 1971.
93. Fair, W. R., Welner, N., and Brorsson, U., Urinary polyamine levels in the diagnosis of carcinoma of the prostate, *J. Urol.*, 114, 88, 1975.
94. Duzendorfer, U. and Russell, D. H., Altered polyamine profiles in prostatic hyperplasia and in kidney tumors, *Cancer Res.*, 38, 2321, 1978.
95. Danzin, C., Jung, M. J., Claverie, N., Grove, J., Sjoerdsma, A., and Koch-Weser, J., Effect of  $\alpha$ -difluoromethylornithine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, on testosterone-induced regeneration of prostate and seminal vesicle in castrated rats, *Biochem. J.*, 160, 507, 1979.
96. Duzendorfer, U. and Feller, H., The effect of  $\alpha$ -difluoromethylornithine and tartaric acid on semen count, seminal GT, FSH, LH, testosterone and steroid excretion in patients with chronic prostatitis, *Andrologia*, 13(2), 100, 1981.
97. Danzin, C., Claverie, N., Wagner, J., Grove, J., and Koch-Weser, J., Effect on prostatic growth of  $\alpha$ -difluoromethylornithine, an effective inhibitor of ornithine decarboxylase, *Biochem. J.*, 202, 175, 1982.

EFFECT OF L-ARGININE ON PANCREATIC ARGINASE ACTIVITY  
AND POLYAMINES IN ALLOXAN TREATED RATS

J.D. Méndez and M.A. Arreola

Experimental Biochemistry Laboratory, Biomedical Research Unit.  
National Medical Center, Mexican Institute of Social Security.  
POB 73032, México 03020, D.F.

Biochemistry Laboratory, Posgraduate and Research Division.  
School of Odontology, National University of Mexico.  
México 04510, D.F.

Received October 2, 1992

## SUMMARY

The effect of L-arginine on the arginase activity and polyamine levels was studied in the pancreas of normal and diabetic rats (120 mg/kg alloxan, i.v.). Four groups were formed (10 male adults per group). I-Control-0.154 M NaCl. II-Diabetic-0.154 M NaCl (96 h after alloxan). III-Control plus 10 mM L-arginine IV-Diabetics plus 10 mM L-arginine. Rats were sacrificed 20 min after L-arginine injection. Glucose in serum and dry weight, proteins, arginase activity and polyamines (HPLC) in pancreas were measured. Higher ratio mg protein/mg dry weight and arginase induction was observed for groups III and IV. Putrescine was low as a consequence of diabetes but restored with L-arginine. The concentrations of spermidine and spermine were lower. These results may suggest that arginine is metabolized to putrescine in the pancreas and that polyamines may be utilized in regenerating processes or for recovering the endocrine pancreatic function.

## INTRODUCTION

Polyamines putrescine, spermidine and spermine are natural constituents of most living organisms. They are synthesized rapidly and markedly by cells with increased metabolic activity after cell stimulation and during developmental growth (1-3). These molecules occur in high concentrations in pancreatic islets (4,5). Their presence is restricted to the insulin-producing beta cells and it has been found that polyamines are associated with the secretory granules. It was also demonstrated that *in vitro* glucose stimulates polyamine biosynthesis not only from ornithine but also from putrescine (5).

In mammals ornithine decarboxylase (ODC, E.C.4.1.1.17) catalyzes the formation of putrescine from ornithine. This reaction is described elsewhere (6-9). Although it has been accepted that ODC is the rate-limiting enzyme in polyamine biosynthesis it is also proposed that the rate of putrescine formation depends

on cellular concentration of ornithine. Since it has been suggested that arginase (E.C. 3.5.3.1) provides ornithine for putrescine synthesis in several glands (10,11) we considered it of great interest to study the arginase activity and pancreatic polyamine levels after L-arginine administration.

In the present study we show the evidence indicating that the supply of L-arginine increased the arginase activity and putrescine formation in the pancreas of normal and alloxan induced diabetic rats.

#### MATERIALS AND METHODS

Male adult Long-Evans rats weighing about 290 - 330 g were divided into four groups with 10 rats per group. Animals fed *ad libitum* were fasted 18 h and grouped as follows: Group I received 1.0 ml 0.154 M NaCl (i.p.) and served as controls. Group II rats were administered 120 mg/kg (i.v.) alloxan 0.154 M NaCl, and served as diabetic controls. Group III intact animals were injected with 10 mM L-arginine (Merck) in 1.0 ml 0.154 M NaCl (i.p.). Group IV rats were diabetized as in group II, but after 96 h were treated with 10 mM L-arginine in 0.154 M NaCl.

Rats were anesthetized with 50 mg/kg ketamine (i.m.) and sacrificed 20 min after each treatment. Blood was taken from aorta and glucose assayed enzymatically by a glucosidase test from Boehringer (Mannheim, F.R.G.).

Pancreases were dissected free of other tissues, rinsed in cold saline solution, dried and weighed;  $1.272 \pm 0.20$  g (mean  $\pm$  S.D.). A 20% homogenate of the pancreatic tissue was prepared in 0.154 M NaCl for dry weight and polyamine determinations. For arginase activity 0.04 M Tris-HCl pH 8.7 containing 0.2 mM  $MnCl_2$  was used.

Dry weight determination. To 10  $\mu$ l of the homogenate in 0.154 M NaCl was added 990  $\mu$ l of distilled water, then 1.0 ml of fresh acid solution of 2% potassium dichromate in concentrated sulphuric acid was added. The reaction occurred spontaneously, the tubes were cooled and the absorbance registered after 10 min at 660 nm using a DU-64 spectrophotometer (Beckman). A 2 mg/ml mannose solution was used as standard (12).

Polyamines were extracted and derived as follows: 1 ml of the saline homogenate was immediately mixed with perchloric acid to a final concentration of 0.2 M, and processed according to Hougaard et al. (5).

Residual material was recovered with 0.05 N HCl. Ten microliters of concentrate solution was evaporated and polyamines dabsylated following the specifications given (non-hydrolysis set from Beckman, cat. N° 240390). Calibration solutions were prepared using hydrochlorides of putrescine, spermidine, and spermine (Sigma).

Polyamines were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described by Lamster et al. (13), with slight modifications. Chromatographic separation was on radial compression C18 10  $\mu$  Li chrosob cartridges (8 mm x 10 cm) from Merck (cat. N° 50334). Detection of dabsylated polyamines was made with a Waters 484 Tunable Absorbance Detector. Peak areas were quantitated with an HP 3390A integrating recorder from Hewlett Packard Instruments (Paramus, NJ, USA).

Arginase activity and basal urea were assayed colorimetrically by the method of Kung et al. (14). Total proteins were determined in the homogenates according to Lowry et al. (15).

The data were analysed statistically using the Fisher's test.

## RESULTS

After 96 h induction of diabetes the weight of diabetic rats was clearly lower than that of normal rats ( $304.44 \pm 9.09$  to  $269.3 \pm 14.60$ , mean  $\pm$  S.D.),  $P < 0.05$ . Blood samples from aorta ensured the diabetic state of animals treated with alloxan (Table 1).

Polyamine measurements are given as nmoles/mg of protein in pancreatic tissue of the four groups studied (Table 2). Putrescine, spermidine and spermine were well detected as its dabsylated derivatives. In general the three polyamine concentrations diminished after the alloxan injection (group II). Putrescine, however, was the only polyamine that increased as response to the L-arginine administration, both in control (group III) and in alloxan induced diabetic rats (group IV), compared with their control groups (I and II). Only minimal peaks were seen for spermidine and spermine whose concentrations were not restored with L-arginine and tends to be lower than that control rats.

Arginase activity diminished under alloxan treatment (group II) but it was markedly stimulated by L-arginine in the diabetized group (IV), although this value did not reach that of the control L-arginine treated group (III). The arginase activity showed a similar pattern to that observed for putrescine (Table 2). Basal urea concentrations were coincident with the activity of arginase in pancreatic tissue of nontreated and treated rats with L-arginine (Table 1). Ratio protein/dry weight was highest for both control treated with L-arginine (III) and diabetic treated groups (IV) compared with those control groups respectively (I and II).

## DISCUSSION

The results presented in this study indicate that polyamine concentrations in the pancreas is affected by alloxan induced diabetes in rats (Table 2). This lowering is accompanied by loss of tissular arginase activity (Table 1). Exogenous L-arginine rapidly restored not only arginase activity in diabetic tissue and increased the activity of this enzyme in normal tissue (Table 1), but also restored the putrescine concentration in the damaged pancreatic tissue. These effects were not observed for spermidine and spermine ( $n = 10$ ). The increase in the arginase activity can be seen by means of the basal urea concentrations in tissue exposed to this aminoacid (Table 1). These results are consistent with those observed by Mallaisse et al. (16), in freshly isolated islets. They found that, after 90 min incubation, neither D-glucose, nor L-arginine or L-ornithine affected significantly the amine islet content. We

Table 1. Mean  $\pm$  S.D. of glucose in serum, arginase activity and other parameters measured in whole pancreas

	Control		L - arginine treatment	
	Group I	Group II	Group III	Group IV
Glucose (mg/dl)	163.05 $\pm$ 43.66	246.22 $\pm$ 67.21*	181.79 $\pm$ 36.01	290.23 $\pm$ 98.68*
Basal Urea (pmoles/mg of protein)	ND	ND	16.12 $\pm$ 6.82*	10.06 $\pm$ 3.50*
Arginase (nmoles urea /mg of protein /min)	78.47 $\pm$ 16.09	65.46 $\pm$ 16.49	149.52 $\pm$ 29.95*	89.27 $\pm$ 37.63
Protein / Dry weight	0.42 $\pm$ 0.14	0.42 $\pm$ 0.15	0.46 $\pm$ 0.13	0.71 $\pm$ 0.09

The values correspond to 10 determinations.

N.D. = non-detectable.

\* The values are significant at  $P < 0.005$  compared with the control.

Table 2. Concentration of polyamine in whole pancreas

Polyamine	Before	L-arginine	After 10 mM	L-arginine
	Group I	Group II	Group III	Group IV
Putrescine	1.23 $\pm$ 0.35	1.11 $\pm$ 0.90	1.84 $\pm$ 0.33	1.25 $\pm$ 0.52
Spermidine	1.31 $\pm$ 0.45	0.44 $\pm$ 0.43*	0.68 $\pm$ 0.23	0.05 $\pm$ 0.03*
Spermine	0.09 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.008

Values are expressed as nmoles/mg of protein,  
and represent the mean  $\pm$  S.D. of 10 determinations.

\* The values are significant at P < 0.10 compared with the control.

observed a similar trend towards an increase in the putrescine content exposed to L-arginine and low concentrations for the other polyamines after 20 min of 10 mM L-arginine administration.

L-arginine stimulates an increase in blood glucose concentration in the normal control and diabetized rats seen at 20 min. This may be due to the glucogenic properties of L-arginine and has also been reported by several authors in animals (17), and humans (18-20).

Since pancreas, unlike liver, lacks other enzymes of the urea cycle, the function of arginase participates in the biosynthesis of putrescine appears particularly attractive because the concentration of this amine increases in the tissues studied, as does the activity of ODC from L-ornithine in isolated islets (16).

It appears that arginase may have a crucial function in pancreatic protein synthesis. In this study a high ratio protein/dry weight for the groups treated with L-arginine (III and IV) was observed. These results may suggest the participation of arginase in the biosynthesis of proteins through putrescine or spermidine and spermine, such interaction may represent part of the mechanism for the regulation of insulin biosynthesis and secretion observed previously (5,21). The incorporation of polyamines, spermidine or spermine into pancreatic proteins *in vivo* by transglutaminases was not studied, but it has been reported to occur in isolated islets (16). To this respect, it has been demonstrated that putrescine and spermidine are necessary for biosynthesis of insulin and protein *in vitro*, whereas spermine depletion affects several processes involved in the insulin metabolism (21).

The results presented provide information about the metabolism of L-arginine in the pancreas *in vivo* and its possible participation as insulin secretagogue. The regulation of insulin and other pancreatic hormones by L-arginine has been extensively studied (22-24). It is possible that arginase, which plays an important role in the urea cycle, is present in the pancreas to supply the ornithine required for polyamine synthesis, in addition to its participation in other metabolic pathways (16). For this reason it is believed that arginase may be one of the enzymes which regulates the initial phase of polyamine biosynthesis in the pancreas.

In conclusion, little is known about the metabolism of the different polyamines *in vivo* and their relation to the pancreas and beta-cell function, but these results support the knowledge that the action of L-arginine could somewhat be related to the metabolism of the polyamines in the pancreas.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Beckman Instruments de México for supplying HPLC kits. We also thank Dr. Elvira Santos and Química Patricia Elizalde from the Laboratorio de Química Orgánica, División de Posgrado, Facultad de Química, UNAM, for the HPLC analysis.

## REFERENCES

1. Bachrach, U. (1973) Function of the Naturally Occurring Polyamines. Academic Press. New York and London.
2. Heby, O., Marton, L.J., Zardi, L., Russel, D.H. and Baserga, R. (1975) *Exp. Cell Res.* 90, 8-14.
3. Jänne, J., Poso, H. and Raina, A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta.* 473, 241-293.
4. Bungay, P.J., Potter, J.M. and Griffin, M. (1984) *Biosci. Rep.*, 4, 869-877.
5. Hougaard, D.M., Nielsen, J.H. and Larsson, L-I. (1986) *Biochem. J.*, 238, 43-47.
6. Heby, O. (1981) *Differentiation* 14, 1-20.
7. Pegg, A.E. (1986) *Biochem. J.*, 234, 249-262.
8. Morgan, D.M.L. (1987) *Essays in Biochemistry* 23, 82-115.
9. Heby, O. and Persson, L. (1990) *TIBS* 15, 153-158.
10. Oka, T. and Perry, J.W. (1974) *Nature* 250, 660-661.
11. Matsuzaki, S., Suzuki, M. and Hamana, K. (1981) *Acta Endocrinológica* 98, 57-61.
12. Bernal, A., Méndez, J.D. y Rosado, A. (1981) *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 12, 83-88.
13. Lamster, I.B., Mandela, R.D., Zove, S.M. and Harper, D.S. (1987) *Archs. oral Biol.*, 32 (5), 329-333.
14. Kung, T.J., Brooks, S.B., Jackway, J.P., Leonard, L.L. and Tamalge, D.W. (1977) *J. Exp. Med.*, 146, 665-672.
15. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
16. Malaisse, W.J., Blachier, F., Mourtada, A., Camara, J., Albor, A., Valverde, I., and Sener, A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1013, 133-143.
17. Nogowsky, L. and Nowak, K.W. (1986) *Horm. Metab. Res.* 18, 730-733.
18. Menchini, M., Meschi, F., Lambiase, R., Puzzovio, M., Del Guercio, M.J. and Chiumello, G., (1980) *J. Pediatrics* 99 (3 P.1), 362-366.
19. Solomon, S.S., Duckworth, W.C., Jallepalli, P., Bobal, M.A. and Iyer, R. (1980) *Diabetes* 29, 22-26.
20. Van Haeften, W.T., Voetberg, G.A., Gerich, J.E. and van der Veen, E.A. (1989) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69 (5), 1059-1064.
21. Welsh, N. and Sjöholm, A. (1988) *Biochem. J.*, 252, 701-707.
22. Seino, Y., Nishi, S. and Imura, H. (1985) *Life Sci.*, 37, 651-656.
23. Curry, D.L., Safarik, R.H. and Reaven, E. (1987) *Horm. Metab. Res.*, 19, 453-457.
24. Zerbib, A., Ribes, G., Gross, R., Puech, R. and Loubatieres-Mariani, M.M. (1989) *Acta Endocrinológica* 121, 345-349.

ANEXO 4**METODOS DE LABORATORIO****DETERMINACION DE GLUCOSA EN SUERO SANGUINEO**

Test-Combinación. Glucosa GOD-POD. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania Occidental.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El peróxido de hidrógeno producido por la oxidación enzimática de glucosa reacciona en presencia de peróxido reductasa (POD) con 4 aminofenazona y el fenol por acoplamiento oxidante forma 4 (-p-benzoquinona-monoimino)-fenazona + agua. La cantidad de cromógeno formado es proporcional a la concentración de glucosa.

REACTIVOS

Cuando el reactivo es reconstituido de acuerdo con las instrucciones, las concentraciones aproximadas de los ingredientes son:

Amortiguador de fosfato	100mmol/ l, pH 7.0
Oxígeno 1-oxidoreductasa (GOD)	8 U/ml.
Peróxido reductasa	1.1. U/ml.
4- aminofenazona	0.77mmol/ l.
Fenol	11mmol/ l.

PREPARACION DEL REACTIVO

Disolver el contenido del frasco que contiene el amortiguador con enzimas con 500 ml ó 1000 ml de agua destilada según sea el caso y añadir 10 ó 20 ml del frasco que contiene fenol. Dar vueltas suavemente. No agitar.

ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

El reactivo no reconstituído debe ser almacenado entre +2 a 8°C y puede ser usado hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta.

El reactivo reconstituído se mantiene estable por 4 semanas a +4°C y 5 días entre 15-52°C en frasco color ámbar.

RECOLECCION Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La glucosa se reporta como estable por 24 horas a 25°C; o por siete días a 4°C si se añade un inhibidor de la glucólisis (NaF, KF). Este reactivo es útil en la determinación de glucosa en suero o plasma de pacientes en ayunas, para lo que se recomienda separar los componentes celulares inmediatamente.

MATERIAL REQUERIDO

Equipo de reactivo para glucosa.

Estándar de glucosa de 1mg/ml en solución salina 0.9%.

Pipetas de precisión.

Tubos de ensayo.

Celdillas para colorímetro.

Agua destilada o deionizada.

#### PROCEDIMIENTO

Longitud de onda: 530 nm.

Temperatura de incubación 37°C

Temperatura de medición: 25°C

Tiempo de reacción: 10 min.

- a) Llevar el colorímetro a cero con agua destilada.
- b) Colocar en los tubos de reacción 20 ul de problema, estándar y agua destilada.
- c) Agregar 2 ml del reactivo a los tubos, mezclar e incubar por 10 min. a 37°C en la oscuridad.

	BLANCO	ESTANDAR	PROBLEMA
AGUA	0.01ml	-	-
ESTANDAR	-	0.01ml	-
PROBLEMA	-	-	0.01ml
REACTIVO	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

- d) Medir el color final en un lapso no mayor de 10 min. posteriores a la incubación, frente al blanco del reactivo.

#### CALCULOS

La concentración de glucosa se calcula como sigue:

$$\text{glucosa} = 100 * \frac{\text{Absorbancia problema} - \text{blanco}}{\text{Absorbancia estándar} - \text{blanco}} \quad [\text{mg/dl}]$$

#### PRECAUCIONES

El reactivo de enzimas no reconstituido, contiene azida de sodio como conservador. Se debe evitar por tanto el contacto con la piel y mucosas. La ingestión de grandes dosis puede provocar vasodilatación.

El reactivo que contiene fenol, es venenoso si está en contacto con la piel o es ingerido. Causa cauterización. En caso de contacto con la piel lavar con polietilenglicol 400.

DETERMINACION DE TRIACILGLICERIDOS EN SUERO SANGUINEO

Reactivo Triacilglicéridos. (Gilford Systems, 132 Artino Street, Oberlin, Ohio, U.S.A.)

FUNDAMENTO

El glicerol producido por la hidrólisis enzimática de triacilglicéridos es fosforilado por adenosininitrofosfatasa (ATP) para producir 1-glicerofosfato y ADP en la reacción catalizada por gliceroquinasa (GK). La glicerofosfato-deshidrogenasa (G-1-PDH) cataliza la oxidación de 1-glicero fosfato en presencia de nicotinamida adenina dinucleótico (NAD<sup>+</sup>) para producir NADH que es usado para reducir el cloruro de 2-tetrazolio (iodofenil-p)-3-(nitrofenil-p)-5-fenil (INT) a formazán en la reacción catalizada por diaforasa. El formazán absorbe la luz a 530 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glicerol y por tanto, a la concentración de triacilglicéridos.

CONTENIDO DEL REACTIVO

Cuando el reactivo es reconstituido de acuerdo con las instrucciones, las concentraciones aproximadas de los ingredientes del reactivo son las siguientes:

ATP	1.0mmol/l.
NAD	1.2mmol/l.
INT	1.0MMOL/l.
GK (microbiana)	120 U/l.
G-1-PDH (músc. conejo)	3500 U/l.
Diaforasa	450 U/l.
Lipasa (microbiana)	1X10 <sup>5</sup> U/l.
Amortiguador (pH 7.7)	

PREPARACION DEL REACTIVO

Reconstituir los frascos del reactivo para triacilglicéridos (Color) en 6.5, 15.5 ó 50 con 6.5 ml, 15.5 ml ó 50 ml de agua destilada o deionizada respectivamente. Dar vueltas ligeramente para disolver. No agitar.

ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

El reactivo no reconstituido debe ser almacenado entre 2-8°C y puede ser usado hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta.

El reactivo reconstituido se mantiene estable por 8 horas a temperatura ambiente (18-25°C) o por 5 días refrigerado (2-8°C) cuando está protegido contra la luz.

RECOLECCION Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Puede usarse suero o plasma obtenido de pacientes en ayunas. Los anticoagulantes tales como EDTA, oxalato o heparina no causan inhibición.

Una hemólisis moderada no afecta significativamente los resultados obtenidos con esta prueba.

No debe usarse citrato de sodio.

Para la obtención de las muestras deben usarse tubos y tapas libres de glicerol.

Los triacilglicéridos se reportan como estables por 3 días a temperatura ambiente. Sin embargo se recomienda almacenamiento refrigerado o congelado de las muestras.

#### DETERMINACION DE UREA (Ref. 41).

##### FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

Para medir el contenido de urea se utiliza una modificación del método propuesto por Geyer y Dabich.

La urea forma en solución ácida de diacetil monoxima en presencia de tiosemicarbazida un complejo colorido que se mide fotométricamente.

##### CONTENIDO

Reactivo colorido. Extracto acuoso de una solución que contiene 2.4 mM de tiosemicarbazida y 41.1 mM de 2-3 butanodien monoxima.

Reactivo ácido. (Se prepara al momento de utilizar). 0.1 ml de cloruro férrico 0.12 M en ácido fosfórico al 56.7%. Esta alícuota se lleva a un volumen de 100 ml con ácido sulfúrico al 20%.

##### PROCEDIMIENTO

Longitud de onda: 530 nm.

Temperatura de reacción: 92°C.

Tiempo de reacción: 25 min.

Temperatura de medición: 25°C.

- a) Llevar el colorímetro a cero con agua destilada.
- b) Colocar en los tubos de reacción 0.2 ml de la muestra problema (previamente tratada), ya sea suero u homogenizado.
- c) Agregar 0.8 ml de agua, 1 ml de monoxima con tiosemicarbazida y 2 ml del reactivo de tricloruro férrico en ácido sulfúrico.
- d) Colocar la mezcla de reacción a 95°C durante 25 minutos.
- e) Una vez enfriados los tubos, proceder a la absorbancia a 530nm.
- f) Al mismo tiempo preparar una curva estándar con urea como sigue:

	ug	UREA	AGUA (ml)	MONOXIMA TIOSEMICAR BAZIDA(ml)	Fe (ml)	CLORURO
BLANCO	0		1	1	2	
1	1.5		0.9	1	2	
2	3.0		0.8	1	2	
3	4.5		0.7	1	2	
4	6.0		0.6	1	2	
5	7.5		0.5	1	2	

DETERMINACION DE PROTEINAS (Ref. 42).

REACTIVOS

- Solución de carbonato de sodio al 2%, tartrato doble de sodio y potasio 0.02%, en hidróxido de sodio 0.1 N.
- Solución de sulfato de cobre pentahidratado al 0.5% en agua destilada.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu en agua (1.1 / 1.4).
- Estándar de albúmina bovina (0.2 mg/ml).
- Mezcla cuproalcalina (50 volúmenes de la solución de carbonato de sodio con un volumen de la solución de sulfato de cobre pentahidratado). Esta mezcla se deberá preparar al momento de usarse.

PROCEDIMIENTO

Longitud de onda: 540 nm.

Tiempo de reacción: 30 min.

Temperatura de medición: t.a.

- Llevar el colorímetro a cero con agua destilada.
- Colocar en los tubos de reacción 0.2 ml de suero previamente diluido.
- Completar a 0.5 ml con agua destilada. Agregar 2 ml de la mezcla cuproalcalina, dejar reposar 10 min. y después agregar 0.2 ml del reactivo diluido de Folin-Ciocalteu.
- Dejar reposar 20 min.
- Proceder a leer el % de absorbancia a 540 nm.
- Al mismo tiempo preparar una curva estándar con albumina bovina como sigue:

	0.2 mg/ml (ug)	(ml)	AGUA ( ml)	MEZCLA CUPROALCA LINA (ml)	REACTIVO FOLIN (ml)
BLANCO	0	0	0.5	2	0.2
1	20.0	0.1	0.4	2	0.2
2	40.0	0.2	0.3	2	0.2
3	60.0	0.3	0.2	2	0.2
4	80.0	0.4	0.1	2	0.2
5	00.0	0.5	0.0	2	0.2

DETERMINACION DE PESO SECO (Ref. 38).

#### REACTIVOS

- a) 1 g de dicromato de potasio en 50 ml. de ácido sulfúrico concentrado. Calentar a 70°C para disolución. Esta solución se debe de preparar al momento de usarse (solución oxidante).
- b) Estándar de manitol (2 mg/ml).

#### PROCEDIMIENTO

Longitud de onda: 660 nm.

Tiempo de reacción: 20 min.

Temperatura de reacción: 92°C.

Temperatura de medición: 20°C.

- a) Llevar el colorímetro a cero con agua destilada.
- b) Colocar en los tubos de reacción 0.1 ml del homogenizado.
- c) Completar a 1.0 ml con agua destilada. Agregar 2 ml de la solución oxidante.
- d) Incubar durante 20 min a 92°C.
- e) Leer la absorbancia a 660 nm.
- f) Al mismo tiempo preparar una curva estándar con manitol como sigue:

	2 mg/ml (ug)	(ml)	(ml)	AGUA OXIDANTE (ml)	SOLUCION
BLANCO	0	0	0	1.0	2
1	400	0.2	0.8	2	
2	800	0.4	0.6	2	
3	1200	0.6	0.4	2	
4	1600	0.8	0.2	2	
5	2000	1.0	0.0	2	

### DETERMINACION COLORIMETRICA DE DNA (Ref. 53).

Esta prueba se basa en la reacción de la desoxiribosa con la difenilamina y se requieren las siguientes soluciones:

#### REACTIVOS

1. Solución estándar de DNA (100 ug/ml).
2. Solución de difenilamina al 4% en ácido acético glacial. Se prepara al momento de usarse
3. Acido perclórico 1 M y 2 M.
4. Solución de acetaldehido de 16 mg/ml (se diluye 1:10 con agua al momento de usarse).
5. La mezcla de reacción se debe de incubar 24 horas a 37°C (\*) y se registra la absorbancia a 660 nm.

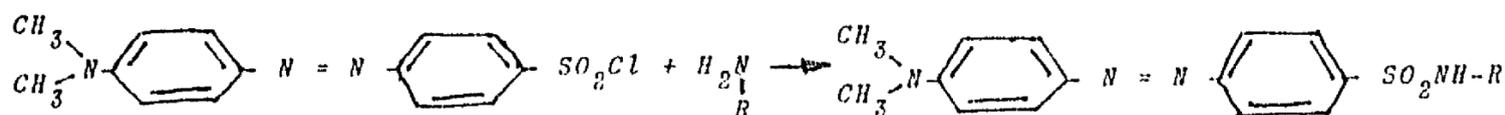
#### PROCEDIMIENTO

TUBO	DNA(100ug/ml) (ug)	HClO <sub>4</sub> 1M (ul)	HClO <sub>4</sub> 2M (ul)	ACETAL DEHIDO (ul)	DFA 4% * Lect en AcOH 660mm (ul)	
B	-	-	200	200	30	250
1	4	40	160	200	30	250
2	8	80	120	200	30	250
3	12	120	80	200	30	250
4	16	160	40	200	30	250
5	20	200	-	200	30	250

### DETERMINACION DE POLIAMINAS

Especificaciones dadas en el instructivo del equipo de dabsilación (non-hydrolisis set de Beckman, cat. No. 240390).

Se utiliza la reacción de poliaminas con cloruro de dabsilo, que se presenta en la figura 7.



Cloruro de dabsilo

Amina

Derivado dabsilado

(Cloruro de 4-dimetilamino  
azobenceno-4'sulfonilo)

Figura 7. Reacción de poliaminas con cloruro de dabsilo.

Las poliaminas son bases alifáticas por lo que pueden ser extraídas por hidrólisis ácida ligera.

Estos compuestos son sometidos a una reacción para formar derivados para su cuantificación por medio de cromatografía líquida de alta resolución.

#### REACTIVOS

Solución de HCl 6 N.

Solución de HCl 0.05 N.

Solución de ácido perclórico 2 M.

Equipo de dabsilación.

#### EQUIPO

Centrífuga

Agitador Vortex

Columna C18 radial pak-nova pak de 4 u, Millipore o

Columna C18 de 10 u, Li Chrsob, Merck

Equipo de HPLC

#### PROCEDIMIENTO

Un ml del homogeneizado de páncreas al 20% (P/V) en solución salina se mezcla con ácido perclórico para tener una concentración final de 0.2 M. A esta solución se le agrega una cantidad conocida de 1,5-diaminopentano (estándar interno). La mezcla se liofiliza y se hidroliza con HCl 6N a 110°C por 16 horas. Después de evapora a sequedad, se redisuelve en NaOH 2N y se extrae con butanol. La fase orgánica se lava con fracciones de 2.0 ml de NaOH, se evapora a sequedad y se redisuelve en HCl 0.05 N (0.5 ml). 10 ul de la solución concentrada se evapora a sequedad en baño maría (60-70°C) en ampolletas de 1 ml, se agregan 20 ul del reactivo número 3 y 40 ul del reactivo número 4 del estuche de reactivos para dabsilación (Beckman catálogo No. 240390). Se sella la ampolleta y se calienta a 70°C durante 12 minutos, se enfria y se toman alicuotas de 10 ul o menos para inyectar al cromatógrafo previamente preparado (fase móvil: tetrahidrofurano grado HPLC, detector ajustado a una longitud de onda de 425 nm).

La concentración se calcula por la integración de las áreas bajo las curvas.