

300627



**UNIVERSIDAD LA SALLE**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS**  
INCORPORADA A LA U. N. A. M.

14  
Zej

**"PROTECCION DEL DAÑO  
PANCREATICO POR POLIAMINAS"**

**TESIS PROFESIONAL**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A  
GRACIELA MIRANDA URIBE

**DIRECTOR DE TESIS:**  
D. en C. JOSE DOMINGO MENDEZ FRANCISCO

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA EXPERIMENTAL  
DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL.**

**Con especial agradecimiento y cariño al D. en C. José Domingo Mendez Francisco.  
Por la dirección de este trabajo y por todo su apoyo y confianza.**

**Con afecto y profunda gratitud a todas las personas que me ayudaron en la realización de este trabajo, especialmente a Emilia Huerta.**

**A MIS PADRES**

**Con sincero agradecimiento y orgullo por su amor, esfuerzos,  
paciencia y apoyo, sin los cuales no hubiera realizado esto.**

**GRACIAS**

**A MIS HERMANOS,**

**Con cariño. Gracias por su interés en que terminara este trabajo.  
Nunca olvidaré todo el apoyo y los ánimos que me dieron.**

**SON LO MAXIMO.**

**A todos aquellos que de alguna manera estuvieron a mi lado durante  
"la carrera", especialmente a Fodis, Luisa, Lupita, Miguel Vázquez,  
Jaime, Jesús y "los Mecánicos".  
Gracias por los momentos compartidos, inolvidables para mí.**



**A FRANCISCO,**

**Con amor. Gracias por tu entusiasmo para hacer las cosas lo mejor posible.  
Tus ilusiones también son mías.**

,

**Reconociendo que todo lo que soy es porque TU así lo has querido.  
TE DOY GRACIAS SEÑOR.**

## PROTECCION DEL DAÑO PANCREATICO POR POLIAMINAS

### INDICE

	Pág.
* INTRODUCCION	1
* OBJETIVO	3
1. GENERALIDADES	4
1.1. Páncreas	4
1.1.1. Función exocrina	6
1.1.2. Función endocrina	7
1.2. Insulina	7
1.2.1. Antecedentes	7
1.2.2. Biosíntesis, transporte y metabolismo de la insulina.	11
1.2.3. Importancia de la acción insulínica	14
1.2.3.1. Secreción de insulina	15
1.2.3.2. Acciones metabólicas de la insulina.	16
1.3. Diabetes	20
1.3.1. Definición de Diabetes Mellitus	20
1.3.2. Clasificación	21
1.3.3. Origen de la Diabetes	25
1.3.3.1. Etiología de la DMID	25
1.3.3.2. Etiología de la DMNID	27
1.3.4. Sintomatología y Fisiopatología	28
1.3.5. Diagnóstico	29

1.3.6. Manejo clínico de la DM: Principios generales	33
1.3.7. Diabetes experimental	34
1.3.7.1. Características generales	34
1.3.7.2. Efectos de la administración de aloxana	36
1.4. Poliaminas	39
1.4.1. Antecedentes	39
1.4.2. Síntesis y regulación	40
1.4.3. Poliaminas y citoprotección	45
1.4.3.1. Definición de citoprotección	45
1.4.3.2. Algunos estudios de poliaminas con efecto citoprotector.	47
1.4.4. Poliaminas y función pancreática	49
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	51
2.1. Hipótesis	51
2.2. Objetivo	51
2.2.1. Objetivo General	51
2.2.2. Objetivo Particular	51
3. MATERIAL Y METODO	52
3.1. Material	52
3.2. Método	52
3.2.1. Descripción de lotes utilizados	52
3.2.2. Metodología	54

<b>4. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
<b>4.1. Determinaciones realizadas en suero.</b>	<b>61</b>
4.1.1. Glucosa	61
4.1.2. $\alpha$ - Amilasa	62
4.1.3. Triglicéridos	62
4.1.4. Proteínas	63
4.1.5. Actividad de Arginasa	63
<b>4.2. Determinaciones en tejido pancreático.</b>	<b>63</b>
4.2.1. Peso seco	63
4.2.2. Actividad de Arginasa	64
4.2.3. Proteínas	64
<b>GRAFICAS DE RESULTADOS</b>	<b>65</b>
<b>TABLA GENERAL DE RESULTADOS</b>	<b>67</b>
<b>TABLAS DE ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS</b>	<b>76</b>
<b>5. DISCUSION DE RESULTADOS</b>	<b>79</b>
<b>5.1. Tratamientos utilizados</b>	<b>79</b>
5.1.1. Aloxana	79
5.1.2. Poliaminas	80
<b>5.2. Parámetros analizados</b>	<b>83</b>
<b>5.2.1. Determinaciones realizadas en suero.</b>	<b>83</b>
5.2.1.1. Glucosa	83
5.2.1.2. $\alpha$ - Amilasa	84
5.2.1.3. Triglicéridos	85
5.2.1.4. Proteínas	86
5.2.1.5. Actividad de Arginasa	86

5.2.2. Determinaciones en tejido pancreático.	87
5.2.2.1. Peso seco	87
5.2.2.2. Proteínas	87
5.2.2.3. Actividad de Arginasa	88
6. CONCLUSIONES	89
* APENDICE	90
A.1 TECNICAS EMPLEADAS	90
A.1.1. Glucosa	90
A.1.2. $\alpha$ - Amilasa	91
A.1.3. Triglicéridos	94
A.1.4. Proteínas	97
A.1.5. Peso seco	99
A.1.6. Actividad de Arginasa	101
* REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	104

## **PROLOGO**

Las sustancias químicas de las cuales están formados los tejidos constituyen fundamentalmente los sitios de acción de los fármacos. Las reacciones químicas entre las poliaminas putrescina, espermidina y espermina con componentes del sistema biológico sobre el cual actúan, logran efectos más o menos complicados según la integración particular de mecanismos bioquímicos y fisiológicos que se modifican como resultado de las mismas.

Con algunos compuestos, las reacciones químicas en las cuales se fundamentan sus efectos son desconocidas, o simplemente sospechadas; de manera similar los mecanismos de acción de las poliaminas sobre el tejido pancreático dañado no están totalmente aclarados pero, los efectos de recuperación son dignos de considerarse.

## **INTRODUCCION**

La Diabetes es una enfermedad muy compleja que se presenta como resultado de deficiencias metabólicas relacionadas principalmente con la acción de la insulina a nivel celular.

Es una enfermedad extendida por todo el mundo que afecta al 3% de la población occidental, porcentaje que se duplica si sólo se considera la población de adultos.

Por su frecuencia y la repercusión individual, familiar y social, se considera como un problema de salud pública de importancia económica notable.

En México, del 8 al 10 % de la población padece diabetes y dependiendo de la entidad, es de la tercera a quinta causa de muerte en el país.

Durante 1991, según datos presentados por el IMSS, la mortalidad por diabetes representó el 12 % de la mortalidad general de la población afiliada ( 7242 defunciones en toda la República Mexicana).

Por el hecho de que la diabetes es incurable y se presenta de diferente manera y en distintos grados de patología, provoca complicaciones que afectan a la mayoría de sistemas y aparatos del organismo ( aparato cardiovascular, sistema nervioso, glóbulo ocular, etc.).

La diabetes es la principal causa de nuevos casos de ceguera en personas entre los 45 y 64 años de edad, las personas con diabetes son 17 veces más susceptibles a daño renal grave que finalmente requiere diálisis; 5 veces más susceptibles a gangrena, lo que ocasiona amputaciones en miembros inferiores (aproximadamente 40 % de amputaciones en personas mayores de 45 años); aumentan las probabilidades de daños cardíacos y embolias, disminuyen



probabilidades de embarazos exitosos, se afecta el crecimiento y desarrollo de los niños, etc.

Todos estos antecedentes nos mueven a reflexionar en la necesidad de adquirir nuevos conocimientos sobre las causas de la diabetes, así como medidas preventivas para disminuir sus complicaciones, desarrollo de medicamentos que puedan mejorar el control de los niveles de glucemia y nuevos métodos de diagnóstico y terapia.

## **OBJETIVO**

Estudiar el efecto citoprotector de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina sobre el páncreas sometido a la acción de aloxana, sustancia que destruye selectivamente las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans.

## 1 GENERALIDADES

### 1.1.- PANCREAS

El páncreas es una glándula mixta que produce secreciones de ambos tipos, endocrina y exocrina. Se encuentra localizado en la parte retroperitoneal del abdomen, por delante de los gruesos vasos abdominales y corresponde a la primera y segunda vértebras lumbares. Está colocado transversalmente entre la segunda porción del duodeno y el bazo y se fija sólidamente al duodeno por medio de tractos conjuntivos; también contribuyen a su fijación los vasos y canales excretores de la glándula. Por medio del peritoneo se fija a la pared posterior del abdomen, sobre todo la cabeza y el cuerpo, pues la cola queda relativamente móvil y unida al bazo por los vasos esplénicos principalmente. (54,22)

Es alargado transversalmente, aplanado y más voluminoso en su extremidad derecha; su forma recuerda a la de un martillo. Posee una coloración blanco rosada en estado fresco, con un peso de sesenta y cinco a setenta gramos en los humanos. Su longitud es de quince centímetros, su altura de siete y su espesor de dos a tres centímetros aproximadamente. Se distinguen de manera general, la extremidad derecha o cabeza, la extremidad izquierda o cola y una porción intermedia o cuerpo.(Fig. 1.1).

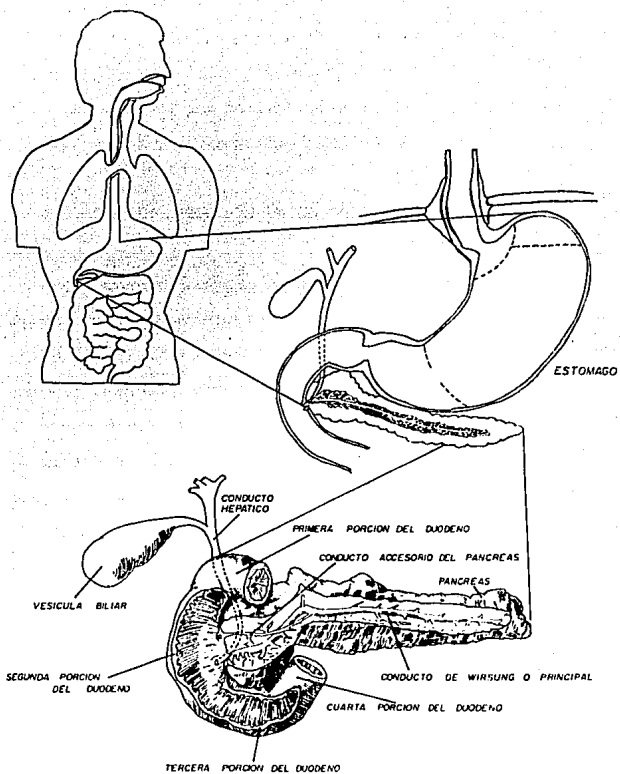


Fig 11 ESQUEMA DEL PANCREAS VISTO DE FRENTE Y SU RELACION CON OTRAS ESTRUCTURAS

Las vías excretoras del páncreas se encuentran formadas por finos conductos intralobulARES llamados conductos intercalares o canales de Boll, los cuales convergen entre sí para formar conductos interlobulARES que desembocan en el conducto principal del páncreas o conducto de Wirsung, y en el conducto accesorio.

#### 1.1.1 .- FUNCION EXOCRINA DEL PANCREAS

La secreción exocrina se forma en los acinos revestidos de células serosas y es transportada por diversos conductos menores hasta el conducto pancreático principal (de Wirsung) aunque la secreción de la parte alta o extremo duodenal del páncreas se vacía en el conducto pancreático accesorio (de Santorini). En el hombre se secreta diariamente cerca de un litro de jugo pancreático, aproximadamente 10 g. de proteína. El páncreas de rata que sólo contiene 0.2 g. de proteína en sus tejidos, sintetiza aproximadamente 0.4 g. de proteína enzimática en 24 horas.

El jugo pancreático contiene enzimas, precursores enzimáticos y electrolitos. La composición de electrolitos difiere de la composición del plasma por cuanto contiene relativamente más  $\text{HCO}_3$  y menos Cl. El pH del jugo pancreático está alrededor de 8 debido a la elevada concentración de bicarbonato, por lo tanto, neutraliza el ácido del quimo al penetrar en el duodeno desde el píloro y proporciona el pH óptimo para las enzimas digestivas secretadas por el páncreas y las glándulas epiteliales de la mucosa intestinal.(21,22)

Varias enzimas que hidrolizan peptonas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos simples y compuestos, son secretadas por el páncreas; ejemplos de éstas son las enzimas proteolíticas pepsina, tripsina y las quimotripsinas A y B; las carboxipeptidasas, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, lipasa, fosfolipasas,  $\alpha$ -amilasa, etc. Una insuficiencia de secreción pancreática produce digestión incompleta.

### 1.1.2 .- FUNCION ENDOCRINA DEL PANCREAS

Dispersos en el páncreas hay acúmulos irregulares de células muy ricas en vasos, los islotes de Langerhans. En el hombre, el páncreas contiene de uno a dos millones de islotes constituyendo la masa total del tejido insular de aproximadamente 1.0 g. Los islotes no están conectados al sistema de conductos pancreáticos y a diferencia de las células acinosas, drenan en la vena porta; comprenden el tejido endocrino del páncreas.

En el hombre 60 a 90 % de las células insulares contienen a las llamadas células  $\beta$  o B, que secretan una hormona proteínica, la insulina. El resto de las células insulares son las células  $\alpha$  que pueden presentarse en dos tipos: células  $\alpha$ -1 o D que secretan somatostatina, la cual también es secretada por el hipotálamo; y células  $\alpha$ -2 o A que secretan la hormona polipeptídica glucagon.

Aunque secretan dos hormonas importantes y diferentes, insulina y glucagon, los islotes de Langerhans pueden considerarse como una sola unidad funcional que actúa para dirigir el flujo de nutrimentos principales, entrando o saliendo de las células según las necesidades de los tejidos y la disponibilidad de productos alimentarios (control global de la homeostasis de nutrimentos).

## 1.2 .- INSULINA

### 1.2.1 .- ANTECEDENTES

La insulina es una de las hormonas más importantes del cuerpo. Sin ella, la muerte ocurre en pocos días.

El nombre "insulina" (que pertenece a los islotes) fue creado por De Meyer en 1909 para describir la hormona, entonces hipotética, producida por los islotes de Langerhans (22). Banting y Best demostraron la actividad hormonal de un extracto de páncreas de perro en 1921 y la estructura completa de la misma fue establecida por Sanger durante los años 1945-55.

La insulina fue sintetizada primeramente por Katsoyannis en 1964, pero la síntesis es complicada y el proceso de producción era inadecuado para cubrir las necesidades de la terapéutica clínica.

En 1967, Steiner y colaboradores (16,17) reportaron que la incubación de los aminoácidos fenilalanina o leucina radiactivos con islotes pancreáticos de rata o tejido humano de los islotes con adenoma, producía dos compuestos proteínicos radioactivos que reaccionaban con anticuerpos de insulina. El aislamiento de los productos mediante la técnica cromatográfica de permeación en gel permitió identificar un compuesto de peso molecular aproximado a 6,000 (insulina) y un compuesto mayor con peso molecular 9,000. Un tratamiento posterior al compuesto mayor con tripsina y carboxipeptidasa dió lugar a un producto idéntico a la insulina.

Al compuesto de peso molecular mayor se le llamó proinsulina y posteriormente se demostró que es el precursor biosintético de la insulina.

Recientemente, estudios sobre la traducción del RNAm de la insulina en un sistema celular libre permitieron identificar al precursor de la proinsulina, la preproinsulina con un peso molecular de 11,500. Esta molécula que contiene 24 aminoácidos adicionales (en los humanos), puede ser detectada en bajas concentraciones en los islotes de Langerhans; pero sufre una acelerada conversión a proinsulina pues es rápidamente hidrolizada por las peptidasas microsomales.

La molécula de insulina es una proteína pequeña que en los humanos tiene un peso molecular 5,808. Está compuesta de dos cadenas peptídicas unidas por enlaces disulfuro (Fig. 1.2). La cadena A tiene 21 aminoácidos y la cadena B

tiene 30 Las secuencias de aminoácidos difieren según las especies. Sin embargo, las insulinas obtenidas del ganado bovino y porcino difieren muy poco de la insulina humana; en consecuencia, estas insulinas tienen poder antigénico relativamente bajo cuando se administran al hombre

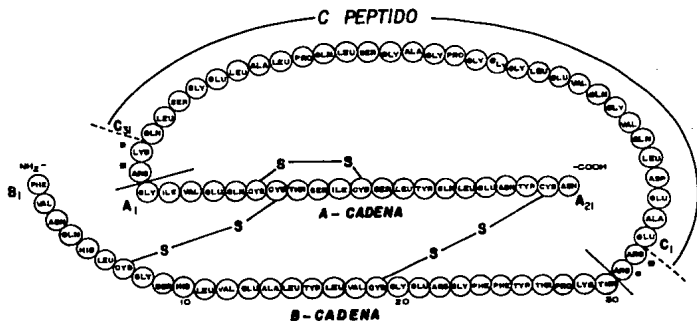


Fig 1 2 ESTRUCTURA DE LA PROINSULINA LA CONSTITUCION DE AMINOACIDOS DE LA CADENA C. DIFIERE SEGUN LAS ESPECIES. LA ESTRUCTURA ORIGINAL SE ROMPE EN DOS PUNTOS POR ENZIMAS DE TIPO TRIPSINA, FORMANDO A LA PROPIA INSULINA, CONSTITUIDA POR LAS CADENAS A Y B UNIDAS POR ENLACES DISULFURO, Y AL PEPTIDO C, EN CONCENTRACIONES EQUIMOLARES

La insulina bovina se diferencia de la humana en que tiene tres aminoácidos diferentes, en el punto 8 de la cadena A, en el punto 10 de la cadena A y en el punto 30 de la cadena B. Es más antigénica que la insulina porcina, que se diferencia de la humana en un sólo aminoácido, el último aminoácido de la cadena B, el 30. (Fig. 1 3).



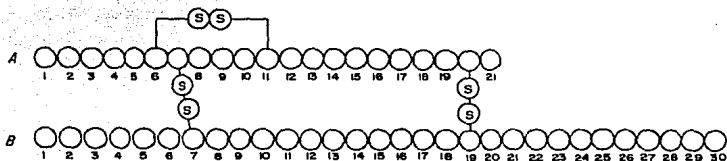
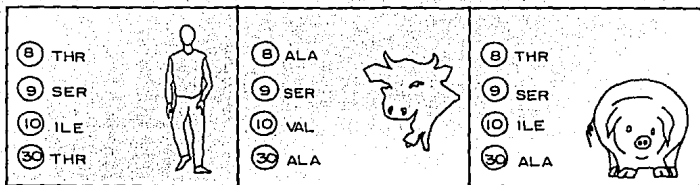


Fig 1 3 ESTRUCTURA DE LAS INSULINAS HUMANA, BOVINA Y PORCINA MOSTRANDO LAS DIFERENCIAS ENTRE SUS AMINOACIDOS.

A pesar de que se siguen utilizando las insulinas bovina y porcina y mezclas de éstas, actualmente se dispone de insulina idéntica a la producida por el cuerpo humano. Comúnmente se le llama "insulina humana" y se elabora mediante dos procesos distintos. Un proceso emplea las glándulas pancreáticas de cerdos y el otro utiliza unión de genes (origen DNA recombinante).

En este último proceso la insulina se sintetiza por medio de una cepa especial no patógena de laboratorio de la bacteria *E. coli*, que ha sido modificada genéticamente mediante la adición de un gene humano para producción de insulina.

(21)

Actualmente existen 46 formulaciones diferentes, correspondiendo las variaciones a las distintas especies, naturaleza, antigenicidad, duración de acción y en algunos países, potencia (concentración).

### 1.2.2. - BIOSINTESIS, TRANSPORTE Y METABOLISMO DE LA INSULINA

El número de células  $\beta$  del páncreas es un millón aproximadamente, constituyendo un 3% de la masa pancreática total, siendo más abundantes en la cola. La secreción diaria total de insulina es de aproximadamente 50 unidades. (22)

La unidad internacional de insulina es la actividad contenida en 0.04167 mg del cuarto Preparado Internacional Estándar (1958). Este preparado estándar es una cantidad de insulina purificada, 52% de páncreas de buey y 48% de páncreas de cerdo.

Cuando se añaden pequeñas cantidades de cloruro de zinc a soluciones de insulina amorfa se obtiene una insulina cristalina de mayor pureza.

La formación de la insulina a través de la proinsulina se lleva a cabo por un proceso genético directo que ocurre en los gránulos de almacenamiento. (Fig. 1.4).

La molécula de insulina, residuo de 51 aminoácidos es derivada de un gene sencillo que codifica al polipéptido preproinsulina con 110 aminoácidos.

La proinsulina humana se constituye por 86 aminoácidos, de los cuales 30 conforman la cadena B de la insulina, 21 la cadena A y 35 el segmento de conexión o cadena C; que adoptan una configuración terciaria característica con formación de enlaces disulfuro que estabilizan la molécula. (Fig. 1.2).

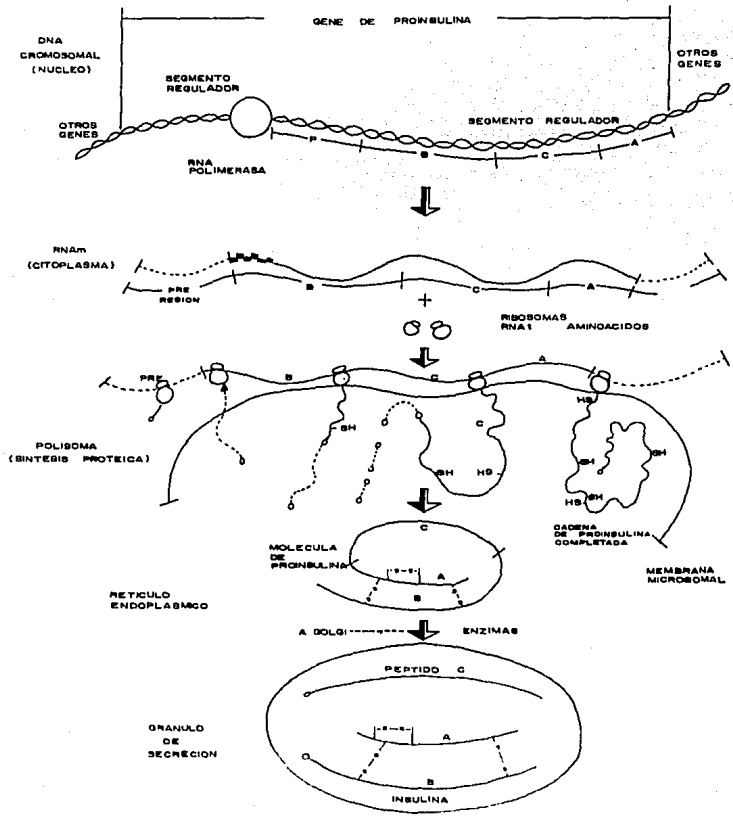
Posteriormente, con la ruptura de la proinsulina se separa un péptido voluminoso de 31 aminoácidos llamado péptido C, dejando las dos cadenas de insulina unidas por enlaces disulfuro.

La síntesis de insulina se inicia cuando el gene de insulina en el núcleo de las células  $\beta$ , codifica para la formación de preproinsulina. Esta información se transcribe en ácido ribonucleico y es transportada al citoplasma por medio del RNAm para que en el retículo endoplásmico rugoso (RER) los ribosomas formen la molécula precursora bajo control de tripletos de secuencias de nucleótidos del RNAm.

La preproinsulina es rápidamente convertida a proinsulina y es transportada del RER al aparato de Golgi, en donde en sitios específicos se concentra en vesículas revestidas de clatrina dando lugar a gránulos inmaduros de secreción.

La conversión de proinsulina a insulina ocurre cuando los gránulos recubiertos pierden su revestimiento por un proceso de maduración en el que la actividad enzimática libera insulina y péptido C. Estos junto con un resto de proinsulina, zinc, calcio, etc. se concentran en los llamados gránulos de almacenamiento y son liberados hacia la circulación en respuesta a un estímulo adecuado como es la presencia de glucosa.

Fig 1 4 RUTA ESQUEMATICA DEL FLUJO DE INFORMACION PARA LA SINTESIS DE INSULINA Y PEPTIDO C. EL RNAm DE LA PREPROINSULINA DIRIGE LA FORMACION DE LA CADENA DE PREPROINSULINA EN LOS POLIRIBOSOMAS. ESTOS AL ASOCIARSE A LAS MEMBRANAS DEL RETICULO ENDOPLASMICO SATURAN LAS CISTERNAS DONDE SE DESDOBLA Y OXIDA LA MOLECULA QUE ORIGINA LA ESTRUCTURA ESTABILIZADA MEDIANTE ENLACES DISULFURO POSTERIORMENTE LA PROINSULINA ES TRANSFERIDA AL APARATO DE GOLGI DONDE SE CONVIERTE EN INSULINA Y PEPTIDO C. QUE SE ALMACENAN EN LOS GRANULOS DE SECCION



La glucosa aumenta la concentración de calcio libre dentro de la célula  $\beta$  y como resultado, el gránulo de secreción es transportado hasta la membrana de la célula por un sistema de túbulos y microfilamentos para que la secreción se realice por un mecanismo de exocitosis.

La proinsulina tiene aproximadamente el 10% de la actividad biológica de la insulina, el péptido C es inactivo. Existen en la literatura casos raros de Diabetes Mellitus (DM) debidos a que no se produce la ruptura de la proinsulina, de modo que la mayor parte de la insulina circulante está en forma de proinsulina, que es biológicamente menos efectiva.(17,22)

### *1.2.3 .- IMPORTANCIA DE LA ACCION INSULINICA*

La función principal de la insulina en el cuerpo, es servir como un mensajero bioquímico para que se emplee la glucosa en vez de la grasa como fuente de energía. Aunque el mensaje es simple, la implementación no lo es. La insulina es la sustancia química que indica a las células individuales del cuerpo qué fuente de energía deben emplear.(18,21,36)

Los niveles de insulina se incrementan cuando hay un exceso de glucosa y descienden cuando no lo hay; este mecanismo adaptativo permite al cuerpo usar el nivel de energía más abundante.

Cuando aparece la diabetes se produce una pérdida fisiológica de la acción de la insulina, obligando a las células a utilizar la fuente de energía equivocada que tiende a producir consecuencias metabólicas muy severas.

### 1.2.3.1 - SECRECION DE INSULINA

Los islotes producen insulina en dos fases (Fig 1.5 línea continua), inmediatamente después de que aumenta la glucemia hay un aumento dramático en la secreción de insulina, logrando llegar a su máximo nivel aproximadamente a los 5 minutos y luego regresa a niveles basales. Posteriormente se incrementa llegando a otro máximo en 45 minutos. A esta actividad fisiológica se le conoce como primera fase y segunda fase de la secreción de insulina. (21)

Al fallar el páncreas, en el caso de la Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente (DMNID), los islotes pierden la primera fase de la secreción de la insulina, sintetizándose solamente en la segunda fase. En la Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMID), tanto la primera como la segunda fase se han perdido.

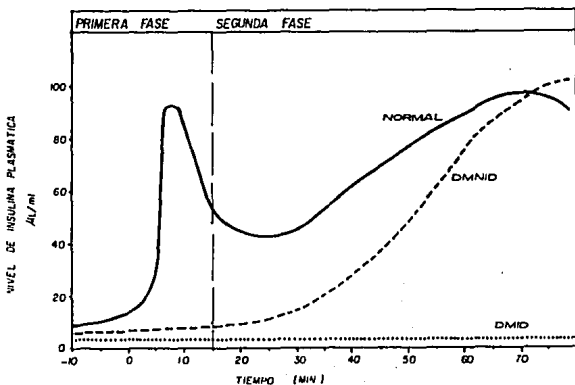


Fig 1.5 RESPUESTA BIFASICA DE LA INSULINA

La semidesintegración de la insulina en el plasma no es mayor de unos pocos minutos, pero los efectos biológicos de la hormona sólo alcanzan su máximo después de dos a cuatro horas.

Dentro de la célula la insulina es destruida por proteasas que rompen los puentes disulfuro y las cadenas A y B. La enzima glutation-insulin-transdehidrogenasa (insulinasa), rompe los puentes disulfuro y está presente en todos los tejidos, principalmente en el hígado y el riñón.

### *1.2.3.2 .- ACCIONES METABOLICAS DE LA INSULINA*

Después de una comida, las concentraciones plasmáticas de glucosa, aminoácidos y lípidos aumentan rápidamente. Los acontecimientos hormonales que siguen a la absorción de estos nutrimentos en el intestino estimulan su captación por las células, de manera que la concentración plasmática recupera los valores normales de reposo. Más tarde los nutrimentos pueden utilizarse para energía, convertirse en moléculas almacenadas más voluminosas, como glucógeno o grasa, o sintetizarse en moléculas que guardan relación con estructura y función. La insulina como regulador hormonal principal de estos procesos metabólicos, interactúa con hormona del crecimiento, glucagon, glucocorticoides, adrenalina, etc, promoviendo un estado anabólico general.

#### *\* METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS*

El aumento de la concentración de glucosa en sangre después de una comida rica en carbohidratos es la primera señal para la secreción de insulina; la respuesta es rápida pues se observan aumentos medibles en la concentración sanguínea de insulina a los dos minutos de aumentar la glucemia. La insulina liberada

actúa rápidamente para disminuir la concentración de glucosa en sangre, incrementando el ritmo de su captación en los tejidos y disminuyendo el de su liberación desde el hígado. (21,22)

La insulina aumenta el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática de las células de muchos tejidos, pero no de todos. Aquellos en los cuales se ha comprobado que la insulina aumenta la captación de glucosa incluyen los tejidos muscular y adiposo, leucocitos, fibroblastos, cristalino del ojo, humor acuoso, hipófisis e hígado. La mayor parte de sistemas de transporte de glucosa de estos tejidos incluyen moléculas portadoras en la membrana. Los tejidos en los cuales la insulina no afecta el transporte de glucosa son el cerebro ( sistema nervioso central ), la retina, los túbulos renales, la mucosa intestinal y los eritrocitos.

En resumen, la acción fundamental de la insulina tiene lugar dentro de la célula y es la culminación de una serie de sucesos:

La célula  $\beta$ , a través de su sensor de glucosa reconoce la elevación de la glucemia y como respuesta, segrega y sintetiza insulina en cantidades apropiadas ( existen además otros activadores de la secreción de insulina que son importantes como la arginina, la leucina, la manosa y el glucagon ). La insulina circulante se une a sus receptores específicos localizados sobre las membranas celulares y es internalizada, facilitando entonces los procesos metabólicos. Una ruptura en cualquier eslabón de esta cadena tendrá el mismo resultado: la alteración del metabolismo celular, siendo la hiperglucemia la consecuencia más evidente, aunque hay también trastornos profundos en el metabolismo protéico y graso. Después de las comidas la insulina controla el ascenso posabsortivo de la glucosa y los aminoácidos en la sangre, promoviendo su almacenamiento en el músculo y en el hígado como glucógeno, y en el tejido adiposo como triglicéridos (TG). Al mismo



tiempo, la insulina suprime la glucogenólisis e inhibe enzimas hepáticas que intervienen en la gluconeogénesis.

Por el contrario, durante el ayuno, se mantienen los niveles normales de glucosa en sangre gracias a la glucogenólisis y gluconeogénesis hepáticas, bajo la influencia del glucagón.

#### **\* METABOLISMO DE PROTEINAS Y METABOLISMO GRASO**

La insulina estimula la captación de aminoácidos por las células y la síntesis de proteínas, además favorece la conversión de ácidos grasos en triglicéridos que son almacenados en el tejido adiposo e inhibe su catabolismo. También controla el nivel de producción de cuerpos cetónicos por el hígado. Por lo tanto, cuando los niveles de insulina son bajos, como en los períodos breves de ayuno, hay una liberación controlada de TG desde los depósitos de grasa y una formación controlada de cuerpos cetónicos por el hígado. Si hay poca o no hay insulina (DMID), la lipólisis y la cetogénesis no estarán controladas. La lipólisis y la cetogénesis descontroladas pueden ocurrir también cuando se produce un exceso de hormonas contrarreguladoras (inducidas por el estrés) en presencia de un bajo nivel de producción de insulina (DMNID).

De modo similar, la insulina favorece la síntesis proteica a partir de aminoácidos e inhibe la proteólisis. En situación de ayuno, el bajo nivel de insulina permite una proteólisis controlada, poniendo a disposición del hígado aminoácidos para la gluconeogénesis. Sin embargo, si no hay insulina (DMID) se produce una proteólisis descontrolada, y un aumento de la gluconeogénesis hepática que contribuye a la hiperglucemia característica. (36,50)

## \* ANTAGONISTAS DE LA INSULINA

Mientras la insulina disminuye la glucemia, otras hormonas como el glucagon, las catecolaminas, el cortisol, la hormona de crecimiento y la tiroxina, la elevan. En este sentido, a las hormonas anteriores se les considera antagonistas de la insulina u hormonas contrarreguladoras. Si alguna de ellas está elevada, las células  $\beta$  responden segregando más insulina. Sin embargo, si la reserva pancreática de células  $\beta$  es inadecuada, aparecerá una diabetes bioquímica o clínica, como en la acromegalia o en el síndrome de Cushing. En la acromegalia hay un incremento en la afinidad de los receptores de insulina y una disminución del número de los mismos.

### 1.3.- DIABETES

#### 1.3.1.- DEFINICION DE DIABETES MELLITUS.

La Diabetes Mellitus (DM) es un trastorno metabólico que resulta de la deficiencia absoluta o relativa de la producción o acción de la insulina. La prevalencia oscila desde el 2-5 % en los países en vías de desarrollo al 5-10 % en los países desarrollados.

En la DM la glucemia está anormalmente alta debido a la falta de la acción insulínica a nivel celular. Aunque se resalta la hiperglucemia, hay también otras alteraciones del metabolismo intermediario y del metabolismo de las grasas y las proteínas. (17,18,21,22)

Los cambios metabólicos en la DM son los mismos que los presentados por pancreatectomía o después de administrar aloxana, que destruye selectivamente las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans. La glucemia aumenta a consecuencia de la producción excesiva de glucosa por el hígado gracias a la glucogenólisis y la gluconeogénesis, y al disminuir la salida de glucosa de la circulación hacia tejido adiposo y músculo. La desintegración proteica aumenta, y disminuye la síntesis de proteína; los aminoácidos son utilizados en exceso para la gluconeogénesis, de manera que se produce atrofia muscular. La urea en sangre aumenta, y se pierde nitrógeno con la orina. Hay aumento de la desintegración de la grasa con incremento de la oxidación de ácidos grasos libres y por lo tanto se producen cantidades elevadas de cuerpos cetónicos en sangre y orina. La producción elevada de cetoácidos puede superar la capacidad del cuerpo para metabolizarlos, de manera que el pH de los fluidos disminuye. La acidosis puede aumentar hasta el punto que se pierda el conocimiento (coma diabético). A medida que aumenta la glucemia se supera la capacidad tubular

renal máxima de resorción para la glucosa, y ésta es eliminada con la orina; por lo tanto se produce deshidratación severa de los tejidos. Si el metabolismo perturbado no se trata, la deshidratación, los trastornos de electrolitos y la cetoacidosis deprimen progresivamente el sistema nervioso central y vienen el coma y la muerte.

### **1.3.2.- CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS**

Por acuerdo internacional se ha clasificado a la DM en cuatro tipos principales:

#### **1 DIABETES TIPO I o DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDIENTE:DMID**

Es el tipo de diabetes donde se presenta una total o parcial eliminación de la secreción de insulina por el páncreas. Aparece normalmente antes de los 30 años de edad por lo que afecta a niños, adolescentes y adultos jóvenes. Los síntomas iniciales pueden ser severos e incluyen pérdida de peso, poliuria y polifagia, los niveles de insulina son prácticamente cero. El paciente insulino-dependiente requiere de insulina de por vida y generalmente mejora al estar bajo el régimen de insulina. Si se suspende la administración de insulina, la cetoacidosis suele ocurrir entre uno y cuatro días y el paciente puede morir a causa del desequilibrio bioquímico. Normalmente son de bajo peso y generalmente presentan anticuerpos contra las células de los islotes de Langerhans, lo cual puede ser parte del proceso y desarrollo de la diabetes. (18,21,25)

En este tipo se desarrollan más frecuentemente complicaciones que en otros tipos. Antes del descubrimiento de la insulina, las personas con diabetes Tipo I usualmente no vivían más de dos años después del diagnóstico. Actualmente, debido a los métodos de tratamiento avanzados, muchas personas con diabetes viven periodos de vida casi normales. Sin embargo, la diabetes puede reducir en un tercio la expectativa de vida normal.

## **2 DIABETES TIPO II o NO INSULINO-DEPENDIENTE: DMNID**

En este tipo de diabetes existe una severa incapacidad de la insulina para funcionar adecuadamente debido a una dramática resistencia a sus acciones causada por un defecto en las células receptoras de insulina; además de que pueden existir defectos en la estructura misma de la insulina. Cerca del 90% de la población diabética presenta este tipo de diabetes. Generalmente se trata de personas mayores de 40 años y la incidencia aumenta con la edad, llegando a afectar a más del 20% de la población de 80 años. La mayoría de los pacientes son diagnosticados accidentalmente, mediante pruebas clínicas rutinarias ante la presencia de otra enfermedad.

Este tipo de pacientes a veces presentan pocos o ningún síntoma y se estima que la mayoría de ellos han tenido el padecimiento entre 5 y 10 años en forma asintomática antes de ser diagnosticado. Los niveles de insulina pueden ser altos, normales o bajos pero no al grado de los pacientes con DMID. Además raramente desarrollan cetoacidosis y cuando lo hacen, es bajo condiciones de estrés excesivo, ante infarto miocardio o por infecciones severas. En los Estados Unidos y Europa, la mayoría de los pacientes son obesos y generalmente no presentan anticuerpos hacia las células de los islotes y si los presentan son en cantidades muy bajas. Es importante mencionar que aproximadamente el 80% de todos los pacientes con DMNID tienen sobrepeso en el momento del diagnóstico y se piensa que muchos de los casos se hubieran prevenido si los individuos hubieran mantenido peso deseable y una buena condición física a través de su vida. El riesgo de desarrollar diabetes Tipo II se duplica con cada 20% de exceso de peso.

La mayoría de los casos de DMNID se pueden controlar con dieta y ejercicio, pero es un hecho que generalmente se requiere de agentes hipoglucemiantes orales (AHO) que son compuestos químicos derivados de las

sulfonilureas y biguanidas que entre sus acciones principales aumentan la liberación basal y liberación estimulada por nutrimentos de insulina; y actúan sobre los receptores de insulina aumentando la captación periférica de glucosa en el músculo, respectivamente. Es necesario que quede cierta función residual pancreática para que su acción se lleve a cabo.

En ocasiones se requiere de insulina de manera transitoria o permanentemente.

### **3 DIABETES GESTACIONAL**

Se considera la tolerancia a la glucosa impedida, de severidad y evolución variables que comienza o se reconoce por primera vez durante el actual embarazo. Esta definición es aplicable en forma independiente de utilizar o no insulina como tratamiento o si la alteración persiste después del embarazo. No excluye la posibilidad de que hubiera estado presente antes de la gestación. Las mujeres que desarrollan este tipo de diabetes son "re-evaluadas" después del parto cuando la glucosa sanguínea regresa a niveles normales. Sin embargo, del 30 al 40% de estas mujeres desarrolla diabetes en los siguientes 5 a 10 años.

### **4 DIABETES SECUNDARIA**

Este tipo de diabetes incluye a pacientes en los cuales la DM es secundaria a drogas (fármacos del tipo de glucocorticoides, diuréticos y agentes adrenérgicos), desajuste hormonal (exceso de hormonas antagónicas a la insulina, como en la enfermedad de Cushing, acromegalia, hipertiroidismo, etc.); o enfermedad pancreática, o está asociada a síndromes genéticos o anomalías del receptor de insulina. En algunos de estos casos la tolerancia insuficiente a la glucosa vuelve a la normalidad cuando la causa desaparece. (21,22)

La pancreatitis crónica (secundaria al abuso de alcohol) produce una disminución en la liberación de insulina y una alteración en el metabolismo de los carbohidratos.

Dentro de la clasificación de diabetes secundaria, se incluyen numerosos trastornos genéticos y cromosómicos que están asociados con un aumento de la incidencia de DM: síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, etc.

No se considera diabetes la "tolerancia de glucosa deteriorada" (Tolerancia insuficiente a la glucosa). Esta condición anteriormente se conocía como "Diabetes Latente o Pre-diabetes" y se presenta cuando una persona tiene niveles normales de glucosa en ayunas, pero con un nivel de 140 mg/dl o de 200 mg/dl después de dos horas del último alimento, es decir, que los niveles de glucosa sanguínea se encuentran entre los límites normales y diabéticos.

Es importante identificar a pacientes en estas condiciones, ya que ellos presentan mayor riesgo de desarrollar DM y aún cuando no desarrollen diabetes, tienen mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares que la población en general. Se tratan con dieta y si es necesario pérdida de peso aunque, algunos médicos sugieren tratamiento con insulina.

Otro tipo de DM (conocida como Tipo III o diabetes de desnutrición) puede estar asociado a la malnutrición protéica, que produce un daño irreparable en las células  $\beta$ . En esta forma de DM la hiperglucemia tiene lugar sin cetoacidosis y los requerimientos de insulina son elevados.

### 1.3.3.- ORIGEN DE LA DIABETES

Las consideraciones sobre la etiología de la DM que se presentan aquí están en relación con unos tipos determinados de DM, puesto que las causas van desde ser la consecuencia de un tratamiento, como en los casos de pancreatectomía, hasta los complejos factores que operan en la DMID y en la DMNID. (21)

#### 1.3.3.1.- ETIOLOGIA DE LA DMID

La DMID es el resultado de los grados variables de insulinopenia que pueden existir a consecuencia de una mala función de las células  $\beta$ . En términos morfológicos, el 90% de la masa de las células  $\beta$  debe ser destruida antes de que aparezca la hiperglucemia crónica. El proceso destructivo es de tipo inmune y la tasa de destrucción es variable.

Se han identificado muchos factores asociados, y a algunos, como la constitución genética, las infecciones virales y las toxinas, se les ha asignado un papel determinante.

#### *Virus y Diabetes Mellitus*

Existen pruebas de que algunos virus, principalmente el virus coxsackie B4, el virus de la parotiditis, el reovirus 3 y el virus de la rubéola pueden dañar las células de los islotes.

En el 30% de los DMID diagnosticados recientemente y con menos de 15 años de edad se encontraron pruebas de una infección reciente por virus coxsackie B, a diferencia de los controles, en los que sólo se encontraba en el 6%.



No está claro si las infecciones virales inician el daño a las células  $\beta$  o dan el golpe final a unas células ya dañadas. Aunque ni el virus coxsackie ni una baja dosis de estreptozolocina provoca la DM en los ratones, este efecto puede conseguirse con la combinación de ambos factores. Así pues, el efecto de los factores ambientales puede ser aditivo.

#### *Herencia*

Se sabe desde hace tiempo que la DM aparece con más frecuencia en algunas familias; sin embargo, el patrón de herencia no parece ajustarse a ninguno de los convencionales. La condición de diabético es tan común, que una historia familiar aparentemente positiva puede deberse simplemente al azar más que ha factores genéticos. El riesgo de padecer DMID del hijo de un DMID es del 2%, mientras que si los dos padres son DMID el riesgo es del 10%. El riesgo de un hermano de un DMID es del 8% aproximadamente.

#### ***\* Síntesis de las posibilidades etiológicas en la DMID***

La información actual sugiere que en un individuo con una constitución genética particular (susceptibilidad genética), algunos factores ambientales (toxinas o virus) dañan a las células  $\beta$  del páncreas, dando lugar a un trastorno autoinmune que conducirá a una disminución gradual y progresiva de la secreción de insulina.

La influencia ambiental debe ser importante, ya que la concordancia para la DMID en gemelos idénticos es únicamente del 50%.

En un individuo con un sistema HLA particular, las células  $\beta$  pueden ser más vulnerables o reaccionar de una manera particular cuando son expuestas a agentes específicos.

Entre las numerosas marcas de nuestra individualidad, las glicoproteínas específicas que se localizan en la superficie de nuestras células nucleadas son las que, diferenciando lo que es propio de lo que es extraño, nos aíslan y protegen de nuestro propio sistema de defensa inmunológico. Estas glicoproteínas se denominan antígenos de histocompatibilidad o antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Así, por ejemplo, la configuración tridimensional de las células  $\beta$  puede ser alterada por una insulitis viral, de modo que el organismo ya no las reconoce como propias, preparando un ataque inmunológico sostenido, con una gradual y progresiva destrucción de células  $\beta$ . (Anticuerpos contra las células de los islotes = "ICA").

#### 1.3.3.2.- ETIOLOGIA DE LA DMNID

La DMNID es heterogénea en su etiología pudiendo haber:

- a) Defectos en el mecanismo secretor de la célula  $\beta$ .
- b) Disminución de la unión de la insulina a sus receptores debido a una disminución en el número o en la afinidad de los mismos.
- c) Defectos posreceptor que alteran el transporte de glucosa al interior de las células.
- d) Regulación defectuosa de liberación de glucosa por el hígado.

Es muy frecuente encontrar una historia familiar de DM en este grupo, y en gemelos idénticos la concordancia es casi del 100%.

El gene de la insulina está situado en el brazo corto del cromosoma 11, y en su vecindad hay una región de ácido desoxirribonucleico (ADN) que es altamente polimórfica.

### 1.3.4.- SINTOMATOLOGIA Y FISIOPATOLOGIA

Los síntomas característicos de la DM son consecuencia de que por una parte la glucosa no puede penetrar a las células provocando una disminución en la producción de energía y en la actividad propia de cada célula; y por otra parte se presenta una acumulación de grandes concentraciones de glucosa en la sangre, y como ésta se transporta por los vasos sanguíneos (arterias y venas), se adhiere poco a poco a las paredes de los vasos, disminuyendo su calibre y por lo tanto el flujo que llega a los tejidos a través de éstos.

Así mismo, al aumentar la glucosa en la sangre, se alteran muchos de los componentes de ésta con las consecuentes alteraciones metabólicas:

1. Polifagia (ingestión exagerada de alimentos), ya que la célula no asimila la glucosa que se encuentra en exceso fuera de ella.

2. Polidipsia (ingestión excesiva de líquidos), como la glucosa se acumula en grandes cantidades en la sangre, la única forma de diluirla es con agua.

3. Poliuria (eliminación excesiva de orina), al beber grandes cantidades de líquido, el exceso de agua y azúcar se elimina por medio de grandes volúmenes de orina.

4. Angiopatía (enfermedades de los vasos sanguíneos), debido a la acumulación de azúcar en las paredes de los vasos, disminuyendo su calibre y haciéndolos poco flexibles, se altera la nutrición de los tejidos a donde llega: pies (pie-diabético, gangrena), corazón (isquemia, infarto o angina de pecho), ojos (alteraciones de la retina y ceguera).

5. Síntomas generales: cansancio, somnolencia, disminución de la capacidad física, dificultad para concentrarse, dolor de cabeza, etc.

### 1.3.5.- DIAGNOSTICO

De acuerdo al criterio de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), el diagnóstico de DM se apoya en tres puntos esenciales:

a)Cuadro clínico. Síntomas cardinales de la enfermedad, poliuria, polidipsia y polifagia principalmente.

b)Glucemia de ayuno. Nivel en plasma venoso igual o mayor de 140 mg/dl en más de una ocasión, comparando con las cifras normales:

	GLUCEMIA DE AYUNO
ADULTOS (HOMBRES Y MUJERES NO EMBARAZADAS)	< 115 mg/dl
NIÑOS	< 130 mg/dl
MUJERES EMBARAZADAS	< 105 mg/dl

c)Prueba de tolerancia a la glucosa. Se determina la habilidad de un individuo para remover una cierta cantidad de glucosa ingerida. Una cantidad de glucosa es administrada oralmente (en adultos la dosis es de 50 a 100 g. o en razón de 1.75 g. por kg. de peso, en niños se utiliza la misma relación con una dosis mínima de 50 g.), la absorción ocurre rápidamente y el nivel de glucosa sanguínea aumenta, estimulando la liberación de insulina, cuya acción disminuye el nivel de glucemia a cifras normales en un plazo de 2 a 3 horas.

Para la interpretación de la prueba de tolerancia a la glucosa se toman en cuenta varios criterios: el método de Wilkerson o método de puntuación, el método de Fajans y Conn, y el método de suma.

En el método de Wilkerson, se asignan valores de puntuación a los niveles de glucosa sanguínea determinados a tiempos 0, 1, 2, y 3 horas.

TIEMPO (Hrs.)	GLUCOSA (mg/dl)		PUNTOS
	SIN EMBARAZO	CON EMBARAZO	
0 AYUNO	130	105	1
1	195	190	0.5
2	140	165	0.5
3	130	145	1

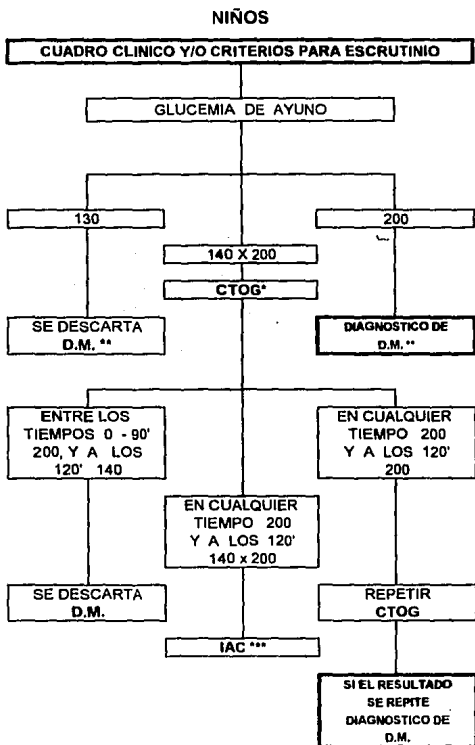
Valores iguales o mayores a los listados acreditan el número de puntos citados. Se considera que existe un estado diabético con 2 - 3 puntos y sospecha de DM con 0.5 - 1.5 puntos.

En el método de Fajans y Conn se diagnostica DM cuando cualquiera de los niveles de glucosa excede a los valores dados:

TIEMPO (Hrs.)	GLUCOSA (mg/dl)
1	185
1.5	165
2	140

En el método de suma, se considera un paciente diabético si el total de los valores obtenidos a 0, 1, 2 y 3 horas es mayor de 600.

Fig. 16 A

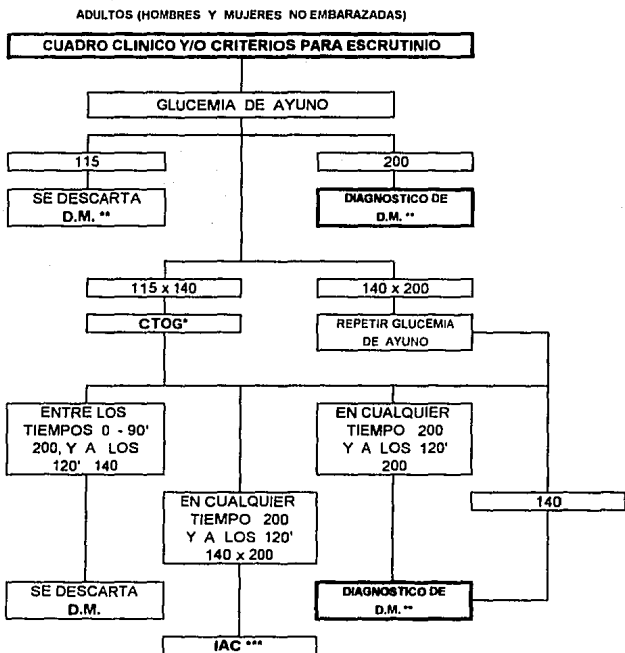


\* Curva de tolerancia oral a la glucosa

\*\* DIABETES MELLITUS

\*\*\* Intolerancia a carbohidratos

Fig. 1.6 B



\* Curva de tolerancia oral a la glucosa

\*\* DIABETES MELLITUS

\*\*\* Intolerancia a carbohidratos

Sin embargo, en la interpretación de la prueba de tolerancia a la glucosa, influyen ciertas variables que deben observarse con el fin de obtener resultados confiables:

- Tipo de fluido a analizar (plasma, suero o sangre total).
- Métodos para determinar la glucosa sanguínea (enzimáticos o reductivos).
- Dosis y concentración de glucosa adecuadas.
- Dieta preparatoria alta en carbohidratos antes de la prueba.
- Actividad física antes y durante la prueba .
- Hora del día.
- Drogas ingeridas.
- Período de ayuno .
- Consideración de enfermedades agudas o crónicas sufridas por el paciente y embarazo.

### 1.3.6 .- MANEJO CLINICO DE LA DM: Principios generales

La DM no tiene cura. Incluso en el caso ideal, por ejemplo un diabético tipo II con sobrepeso en el que la pérdida de peso lleva a la normalidad la Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG), el trastorno está latente y aparecerá si no se mantiene el control de peso. (21,25)

Todos los programas de tratamiento tratan de corregir la hiperglucemia mediante programas de nutrición y ejercicio, junto con los hipoglucemiantes orales o la insulina.

El programa para cada paciente debe ser individual y considerar factores como:



1. Grado de desajuste metabólico.
2. Edad y dependencia.
3. Desviación del peso corporal ideal.
4. Ocupación.
5. Capacidad para aprender y obedecer.
6. Circunstancias sociales.

En todos los casos, el objetivo mínimo es establecer y mantener el grado de control metabólico necesario para la supervivencia, la abolición de los síntomas y evitar las complicaciones agudas tales como la cetoacidosis o la hipoglucemia.

El tratamiento completo de la DM debe incluir:

- a. Plan nutricional.
- b. Ejercicio.
- c. Hipoglucemiantes orales.
- d. Insulina.
- e. Facilidades clínicas, con servicios de emergencia siempre disponibles.
- f. Un programa de educación, sin el cual todas las terapéuticas fracasarán.

### **1.3.7.- DIABETES EXPERIMENTAL**

#### **1.3.7.1.- CARACTERISTICAS GENERALES**

Diversas sustancias químicas causan degeneración selectiva de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans (sustancias  $\beta$  citotóxicas) y, por lo tanto, provocan un estado de diabetes que se ha denominado diabetes experimental .(7,21,22)

Dentro de estas sustancias se incluyen la aloxana, ácido úrico, ácido deshidroascórbico, ácido deshidroisoascórbico, algunas quinolonas, estreptozotocina y sales de magnesio. La aloxana ha resultado útil en experimentos con animales como medio adecuado para producir diabetes por deficiencia de insulina, con una duración no necesariamente permanente. (Fig. 1.7)

Los mecanismos de acción de las sustancias antes señaladas no se conocen con certeza. El tratamiento con algunos compuestos sulfhidrilicos (glutación, cisteína, dimercaprol) inmediatamente antes de la aloxana impide la destrucción de las células  $\beta$ , sugiriendo que la aloxana también puede actuar inhibiendo enzimas que contengan grupos sulfhidrilo. Sin embargo, el ácido nicotínico, el ácido piridindicarboxílico, el bisulfito sódico y el azul de metileno, que no contienen grupos sulfhidrilos, ejercen una acción protectora similar.

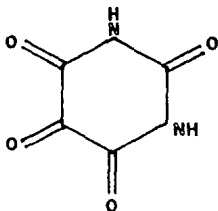


Fig 1.7 ALOXANA. SUSTANCIA  $\beta$  CITOTOXICA

El efecto diabetogénico de la aloxana fue descubierto por Dunn y colaboradores y suplenentó las formas de diabetes experimental ya conocidas, pancreotomía y diabetes causada por alteraciones de la hormona del crecimiento; siendo el principio de una intensa investigación sobre la "diabetes química". (7)

La diabetes causada por aloxana presenta los signos característicos de la diabetes humana (hiperglucemia, glucosuria, polidipsia, poliuria, pérdida de peso corporal, polifagia, cetonuria y acidosis) en conejos, rata, perro, hamster, gato, oveja, mono y ratón.

Se ha producido diabetes después de la administración de aloxana vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, oral, enteral e intrapulmonar. La aloxana pasa fácilmente de los tejidos a la circulación, por lo cual, la vía de administración está influida por la dosis de aplicación, el daño que se desee causar y la disponibilidad que se tenga con el modelo experimental.

En ratas, la dosis normalmente utilizada para producir diabetes es de 100-200 mg/kg de peso, vía intravenosa.

#### *1.3.7.2.- EFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE ALOXANA*

##### *\* CAMBIOS HISTOLOGICOS EN LOS ISLOTES DE LANGERHANS*

Una dosis diabetogénica de aloxana produce necrosis masiva de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en la mayoría de los mamíferos.

A pesar de que la aloxana es  $\beta$  citotóxica, una dosis elevada causa daños secundarios reversibles en la mayoría de los casos, en el riñón, principalmente cambios hidrópicos, necrosis y descamación de las células tubulares.

## \* CAMBIOS EN LOS NIVELES DE DIVERSOS PARAMETROS

### BIOQUIMICOS

En animales, el nivel de glucosa sanguínea fluctúa de una manera característica normalmente trifásica, después de una dosis diabética de aloxana.

Estas fases que representan el desarrollo de la diabetes con aloxana son:

1. Una rápida y marcada hiperglucemia de corta duración (1 a 4 horas), representada por una repentina disminución o interrupción de la liberación de insulina; y por un efecto glucogenolítico en el hígado iniciado por la falta de glucosa bajo influencia adrenal.

2. Una hipoglucemia más o menos severa de duración de hasta 48 horas, que provoca algunas veces convulsiones y muerte, la cual puede ser prevenida con tratamiento con glucosa.

Esta fase es producida por la insulina presente que no es inactivada por la aloxana, es decir, es la consecuencia de un derramamiento incontrolado de insulina de las células  $\beta$  dañadas.

3. Una hiperglucemia crónica de largo pero no necesariamente permanente duración, producida por la falta de insulina debido a que las células  $\beta$  han sido necrosadas.

El glucagón del hígado se agota durante la primera fase, observándose las más bajas concentraciones en el nivel máximo de hiperglucemia.

Durante la segunda fase, los niveles de glucógeno en el hígado se incrementan alcanzándose cifras basales.

En la tercera fase, los niveles de glucógeno en el hígado permanecen en niveles disminuidos a los normales. (22)

Los niveles de insulina plasmática disminuyen radicalmente durante la primera fase, posteriormente se incrementan a niveles superiores a los normales, siendo más altos con la hipoglucemia más intensa.

En el estado crónico de diabetes, los niveles disminuyen a niveles por debajo de lo normal, llegando a ser inmedibles en el transcurso de pocas semanas.

## 1.4 .- POLIAMINAS

### 1.4.1 .- ANTECEDENTES

Las poliaminas putrescina, espermina y espermidina son compuestos que se producen de manera natural en todos los tejidos. (20,22,31,32).

A pesar de que la función fisiológica de estas aminas no ha sido totalmente comprendida a nivel molecular, estudios recientes han mostrado que sus concentraciones son finamente reguladas y que el crecimiento celular normal, la multiplicación y la diferenciación requieren de poliaminas. Estas moléculas a semejanza de los ácidos nucleicos, los aminoácidos y las proteínas, se encuentran distribuidas ampliamente en los sistemas vivientes, lo que quizás constituye un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de la función celular.(Fig. 1.8).

Hay concentraciones de espermina y espermidina particularmente elevadas en la secreción de la glándula prostática de diversas especies, incluyendo al hombre, y los nombres de las aminas derivan de que primero se descubrieron en el semen. En el semen humano la concentración de espermina varía entre 50 y 350 mg/100 ml; la de espermidina es unas 12 veces menor.

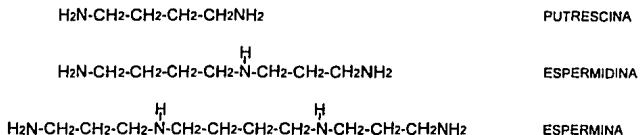


Fig. 1.8 POLIAMINAS

Se ha comprobado que las poliaminas son poderosos estimulantes del crecimiento de microorganismos, de tejidos vegetales y de células de mamífero cultivadas. Ejercen varias acciones sobre el control del metabolismo del ácido nucleico, que probablemente tiene algún efecto sobre el crecimiento. (8,9,10,20).

La función biológica de las poliaminas ha sido tema de muchas investigaciones, sin embargo, existe poca información acerca de la actividad farmacológica de dichas moléculas. La putrescina ha sido administrada a ratas por vía intraperitoneal en dosis de 200-400 mg/kg de peso e inyectada en cerebro por vía ventricular (100 nmol/rata) con lo que se ha demostrado que esta diamina tiene un efecto analgésico-dosis dependiente. En estas circunstancias no se ha observado ninguna toxicidad colateral.

Las concentraciones tisulares de poliaminas han sido determinadas en algunos órganos y se sabe que el páncreas de rata contiene 8.62 moles de espermidina y 0.8 moles de espermina por gramo de peso húmedo, a diferencia del cerebro humano que únicamente contiene 0.23 y 0.10 moles por gramo de peso húmedo respectivamente. (11,14,27).

#### *1.4.2.- SINTESIS Y REGULACION*

En los mamíferos, la biosíntesis de poliaminas se lleva a cabo a partir de la ornitina, por lo tanto, la ruta que conduce a la formación de la putrescina es a través de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC). La putrescina es el precursor de la síntesis de la espermidina y la espermina. (20,28,46,48).

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, recordándose que su participación fisiológica se relaciona con el ciclo de la urea.(47,51).

Para convertir a la putrescina en espermidina y ésta a su vez en espermina, 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 ( $(CH_2)_3 - NH_2$ ) 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.

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 sintasa y espermina sintasa, respectivamente.(Fig. 1.9)

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-adenosilhomocisteamina. Sin embargo, en el caso de la espermidina sintasa 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 sintasas son irreversibles, y que la conversión de la espermina en espermidina y de espermidina en putrescina ocurre in vivo por la acción de otras enzimas como la N-acetil transferasa y la poliamina oxidasa.



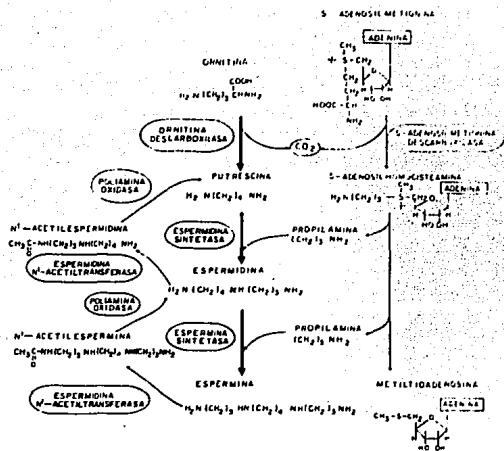


Fig. 19 BIOSINTESIS DE POLIAMINAS

Se sabe que 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 acción enzimática intensa, hay acumulación intracelular de poliaminas (20,27)

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 demostrar si este incremento es circunstancial o esencial para que las células entren en actividad mitótica.

Como se mencionaba anteriormente, existe una interacción entre el ciclo de la urea y la biosíntesis de poliaminas. El ciclo de la urea ha sido bien identificado en su conjunto y actualmente se sabe que consiste en cinco pasos, regulados enzimáticamente:

- 1) Conversión de bicarbonato y amonio en carbamilsulfato.
- 2) Formación de citrulina a partir de ornitina y carbamilsulfato.
- 3) Conversión de citrulina y aspartato en arginino-succinato.
- 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. El último paso es catalizado por la enzima citoplasmática arginasa. 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 en los vertebrados terrestres, como anfibios y mamíferos, están muy relacionados también con el ciclo de Krebs o del ácido cítrico. (Fig. 1.10)

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 1mM, mientras que la putrescina está generalmente presente en concentraciones bajas, excepto en tejidos que están estimulados al crecimiento o que tienen un comportamiento celular proliferativo, como es el caso de la médula.

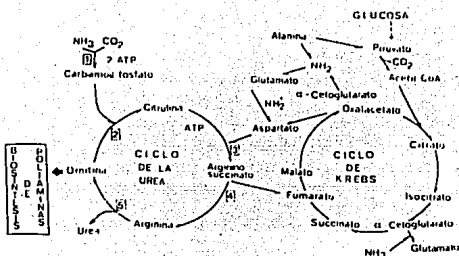


Fig. 1.10 INTERACCIONES ENTRE EL CICLO DE LA UREA, EL CICLO DE KREBS Y LA BIOSÍNTESIS DE POLIAMINAS.

El metabolismo de poliaminas ha sido estudiado en animales y en humanos, durante la gestación y en diferentes condiciones de salud y enfermedad. Se ha hecho una descripción amplia de la participación de las poliaminas en relación con sucesos normales, trastornos del crecimiento, enfermedades genéticas y otras alteraciones relacionadas con la fisiología renal.(13,14,26,27).

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.(38)

#### *1.4.3.- POLIAMINAS Y CITOPROTECCION*

##### *1.4.3.1.- DEFINICION DE CITOPROTECCION*

El término "citoprotección" originalmente describía de manera precisa al fenómeno por el cual ciertas sustancias, particularmente las prostaglandinas, protegen las capas más profundas de la mucosa gástrica, de la inflamación y la necrosis debidas a la exposición a agentes nocivos; independientemente de cualquier efecto inhibitorio sobre la secreción gástrica ácida.(6,30,33,34)

Esta descripción toma en cuenta los descubrimientos realizados por Lacy e Ito (52), en los cuales se observó que en animales a los que se administró oralmente algún agente necrotizante como etanol, el tratamiento con prostaglandinas confiere una citoprotección de incluso el 90 % de la población celular epitelial, es decir, células mucosas, parietales y células de reserva, así como células de la lámina propia de la mucosa gástrica.

En otros estudios se ha observado que cuando son administrados oralmente etanol absoluto o cualquier otro agente necrotizante, se desarrolla una necrosis hemorrágica masiva en la mucosa gástrica casi al minuto y, esta severa necrosis se previene con una amplia variedad de prostaglandinas (37,40,52,53). Más aún, el tipo de prostaglandina utilizado es un factor en la eficiencia de esta protección.

Sin embargo, la citoprotección no está solo confinada a las prostaglandinas. A pesar de que éstas fueron las primeras sustancias que se reportaron como "citoprotectoras" y, son consideradas por algunos investigadores como las más potentes al respecto, está bien establecido que otros compuestos presentan la misma propiedad. Se ha reportado la capacidad citoprotectora de tres agentes químicos no relacionados a las prostaglandinas, ácido salicílico, acetazolamida, y algunos antibióticos.

Algunos compuestos parecen ser citoprotectores por estimulación de la formación de prostaglandinas endógenas por el estómago, algunos ejemplos son los llamados estimulantes moderados, el sucralfato y las sales de bismuto; mientras que otros como el maleato de dietilo, algunos fosfolípidos, reactivos sulfhidrúlicos y algunos benzimidazoles sustituidos, parecen actuar a través de diferentes mecanismos. (6,30,39)

Actualmente, se realizan exhaustivas investigaciones con el fin de entender los mecanismos fundamentales de este importante fenómeno de protección celular tanto en el estómago (mucosa gástrica a diferentes niveles), como en otros órganos y tejidos vía otros compuestos químicos como las prostaciclina sobre la isquemia miocárdica, pancreatitis inducida por etionina (41) y el daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub> en ratas (43); o las poliaminas como regeneradoras de tejido hepático y gástrico entre otros.(9,33,34)

#### 1.4.3.2 - ALGUNOS ESTUDIOS DE POLIAMINAS CON EFECTO CITOPROTECTOR

El hecho de que las poliaminas espermina, espermidina y su precursor putrescina, se encuentren ampliamente distribuidas en los tejidos vivos, ha llevado a realizar algunas investigaciones sobre esta base.(8,12,13)

Al respecto se ha observado la participación de la espermina en la recuperación del hígado con daño inducido por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>).

La espermina administrada intragástricamente en ratas después de la inducción del daño hepático da lugar a un aumento en la actividad de arginasa (A.A.), así como el contenido de proteína total. Histológicamente los animales tratados con espermina presentan menor daño centrolobular residual y cambios citológicos definitivos de regeneración.

Otros estudios también han mostrado que después de una hepatectomía parcial hay un aumento dramático en la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) hepática residual, lo cual indica que esta enzima es clave en la síntesis de poliaminas.(28)

Estudios realizados con la mucosa gástrica aislada de conejos blancos Nueva Zelanda, indican cambios muy significativos en la secreción ácida cuando se administra espermina, lográndose una disminución hasta del 80 % siendo el efecto transitorio y observándose que una dosis adicional de espermina presenta un efecto similar al de la dosis inicial.(8)

Dentro del grupo de poliaminas que inhiben la secreción ácida gástrica, se ha clasificado a la espermina como el agente más potente probado con este fin

y, es por ello que algunos investigadores la han sugerido como posible agente terapéutico.

Otros experimentos realizados con ratas Sprague-Dawley han mostrado que las poliaminas, al igual que las prostaglandinas protegen a la mucosa gástrica de severos agentes necrosantes como es el etanol acidificado.(9)

Se ha reportado que la administración oral de poliaminas evita la formación de lesiones de la mucosa gástrica inducidas por etanol al 90 % en HCl 150 mM, de manera dosis dependiente, con el siguiente orden de potencia protectora:

espermina - espermidina - putrescina  
1o.                      2o.                      3o.

Se ha observado que las lesiones producidas por el agente causante de la necrosis están acompañadas por incrementos en los niveles de peróxidos lipídicos de la mucosa gástrica y, que éstos han disminuído con dosis protectoras de espermina.

Investigaciones adicionales revelan que las poliaminas inhiben la peroxidación lipídica "in vitro", inducida por un ión metálico (Fe++) en mucosa gástrica de porcino, con el mismo orden de potencia mencionado anteriormente.

Es muy probable que la citoprotección proporcionada por las poliaminas se deba a sus acciones antiperoxidativas, sin embargo, los mecanismos detallados de lo que se entiende por citoprotección no están del todo comprendidos.(34)

#### 1.4.4.- POLIAMINAS Y FUNCION PANCREATICA

Estudios realizados con un análogo de la colecistoquinina, la caeruleina, administrada al páncreas de rata Sprague-Dawley demuestran que la activación del metabolismo de las poliaminas puede ser un importante factor para promover el crecimiento celular pancreático.(13)

A pesar de que existe muy poca información disponible acerca de los mecanismos por los cuales esta hormona gastrointestinal puede regular la síntesis de DNA y el crecimiento pancreático, ha sido demostrado en diversos tejidos de mamífero que, algunas hormonas y factores promotores de crecimiento cambian de manera importante el metabolismo de las poliaminas interviniendo en la actividad de enzimas involucradas en su biosíntesis, particularmente en la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) responsable de la síntesis de putrescina; lo cual justifica estos estudios.

Para evaluar cualquier correlación entre el crecimiento pancreático y el contenido celular de poliaminas, se ha relacionado estadísticamente el peso pancreático y el contenido de DNA con el contenido total de putrescina, espermidina y espermina durante el tratamiento con caeruleina.

Se ha demostrado que las poliaminas son necesarias para el crecimiento pancreático debido a su biosíntesis y acumulación primero, con incrementos en la concentración de putrescina paralelamente a incrementos en niveles de proteínas y RNA y posteriormente con incrementos en el contenido de DNA y masa celular observados.(14,51)



Se han desarrollado métodos citoquímicos de fluorescencia específicos para poliaminas que permiten localizar en el páncreas endocrino de ratas y ratones, elevadas concentraciones de espermina y espermidina.(51)

Las poliaminas se asocian particularmente con las células  $\beta$  productoras de insulina y principalmente con los gránulos de secreción.(49). Se ha comprobado "in vitro" que la glucosa estimula su biosíntesis y esto podría significar que las poliaminas en determinadas condiciones estimulan la liberación de insulina. La mayoría de los estudios realizados al respecto indican que existe evidencia química de que las poliaminas causan un incremento en el transporte de glucosa y estimulan su completa oxidación en células adiposas, relacionándose así con la actividad de la insulina.(27,44,12,15)

## **2 DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **2.1.- HIPOTESIS**

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina protegen del daño celular al tejido pancreático sometido a la acción de aloxana.

### **2.2.- OBJETIVO**

Como ya se había descrito anteriormente, el presente trabajo de tesis tiene como finalidad lo siguiente:

#### **2.2.1.- OBJETIVO GENERAL:**

Estudiar el efecto citoprotector de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina administradas antes de la aplicación de aloxana.

#### **2.2.2.- OBJETIVO PARTICULAR:**

Determinar diferentes parámetros bioquímicos indicadores de la función endocrina del páncreas.

### 3 MATERIAL Y METODO

#### 3.1.- MATERIAL

\* Material biológico:

Se utilizaron ratas macho de la cepa Long Evans de 3 a 5 meses de edad, de 250 a 300 g. de peso, las cuales se mantuvieron en un bioterio bajo condiciones controladas de luz y temperatura, alimentadas "ad libitum".

\* Material químico:

Incluye todos los compuestos químicos empleados en los diferentes tratamientos (tranquilizante, anestésico, aloxana, poliaminas, etc.) y, todos los reactivos necesarios para las determinaciones bioquímicas. (Ver Apéndice)

#### 3.2.- METODO

Las ratas se dividieron en lotes o grupos de investigación de 10 ratas a los que se aplicó el tratamiento que se describe a continuación.

##### 3.2.1.- DESCRIPCION DE LOTES UTILIZADOS

GRUPO I: CONTROL.- Ratas a las cuales no se aplicó tratamiento alguno.

GRUPO IIp: CONTROL DIABETICO (Sin pretratamiento con poliaminas).

Tratamiento con aloxana i.v. en dosis de 120 mg/kg de peso.

Ratas sacrificadas a las 96hrs. de aplicada la aloxana.

- GRUPO II: CONTROL DIABETICO (Sin pretratamiento con poliaminas).  
Tratamiento con aloxana i.v. en dosis de 200 mg/kg de peso.  
Ratas sacrificadas a las 24hrs. de aplicada la aloxana.
- GRUPO III: PUTRESCINA.- Pretratamiento con 50mg/kg. i.p. de una sol. de 75 mg/ml, administrada 1 hr. antes de la dosis de aloxana de 200 mg/kg de peso.  
Ratas sacrificadas a las 24 hrs .de aplicada la aloxana.
- GRUPO IVp: ESPERMIDINA.- Pretratamiento con:
- a) 100 mcg/kg ORAL
  - b)100 mg/kg. ORAL SE UTILIZA una sol. de 50 mcg/ml, administrada 1 hr. antes de la dosis de aloxana de 120 mg/kg.
- Ratas sacrificadas a las 96 hrs. de aplicada la aloxana.
- GRUPO IV: ESPERMIDINA.- Pretratamiento con 50 mg/kg.i.p., de una sol. de 75 mg/ml, administrada 1 hr. antes de la dosis de aloxana de 200 mg/kg de peso.  
Ratas sacrificadas a las 24 hrs.de aplicada la aloxana.
- GRUPO Vp 1: ESPERMINA.- Pretratamiento con 50 mg/kg. ORAL, de una sol. de 50 mg/ml, administrada 1 hr. antes de la dosis de aloxana de 200 mg/kg de peso.  
Ratas sacrificadas a las 24 hrs. de aplicada la aloxana.
- GRUPO Vp 2: ESPERMINA.- Pretratamiento con 50 mg/kg. i.p. de una sol. de 50 mg/ml, administrada 1 hr. antes de la dosis de aloxana de 200 mg/kg de peso.  
Ratas sacrificadas a las 24 hrs. de aplicada la aloxana.

**GRUPO V : ESPERMINA.-** Pretratamiento con 50mg/kg. i.p., de una sol. de 75 mg/ml, administrada 1 hr. antes de la dosis de aloxana de 200 mg/kg de peso.

Ratas sacrificadas a las 24 hrs. de aplicada la aloxana.

### **3.2.2.- METODOLOGIA**

La metodología experimental utilizada para todos los grupos tratados se describe con los siguientes diagramas:

Fig. 3 1

DIAGRAMA DE FLUJO DEL METODO EXPERIMENTAL GENERAL

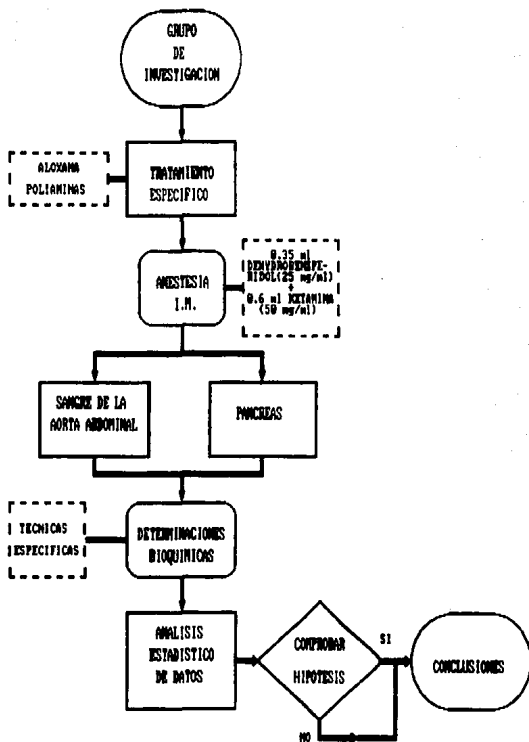


Fig 32

PARAMETROS BIOQUIMICOS DETERMINADOS EN LA MUESTRA DE SANGRE  
DE RATAS CONTROL Y CON TRATAMIENTO

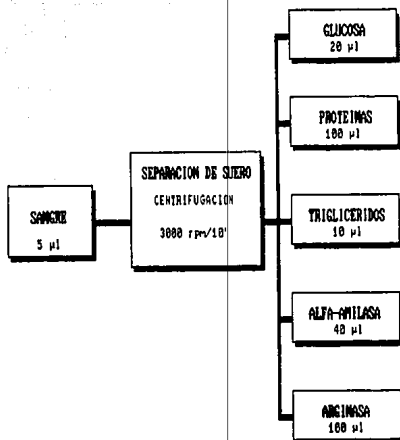


Fig 33

DETERMINACIONES REALIZADAS EN TEJIDO PANCREATICO DE RATAS

CONTROL Y CON TRATAMIENTO

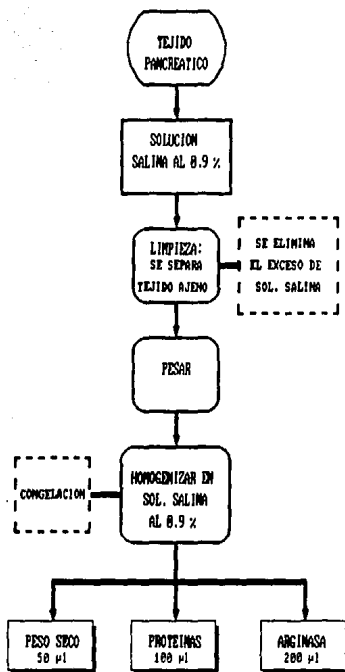
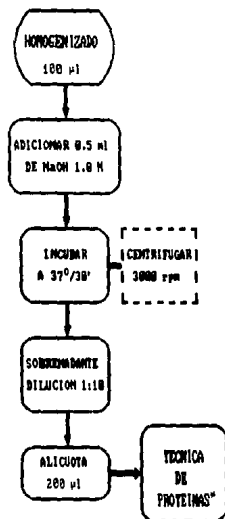




Fig. 3.4 A

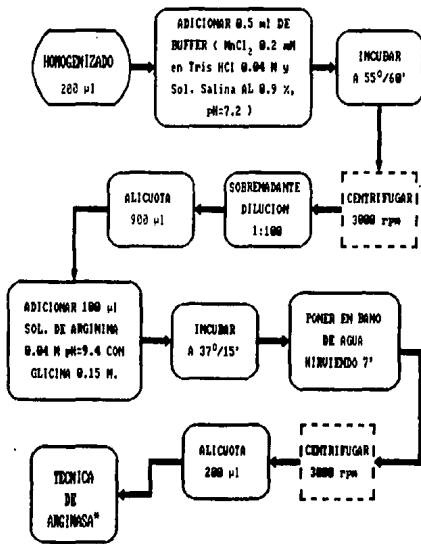
PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LAS DIFERENTES  
DETERMINACIONES



\* VER APENDICE

Fig 3 4 B

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA DETERMINACION DE  
ACTIVIDAD DE ARGINASA



\* VER APENDICE

#### **4 RESULTADOS**

Los resultados obtenidos del presente estudio sobre el efecto protector de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina, de acuerdo con el modelo experimental propuesto; se presentan en forma de tablas descriptivas de parámetros bioquímicos medidos y gráficas comparativas en las cuales se ven reflejados los valores obtenidos para cada grupo de ratas implicado.

Adicionalmente, se hacen algunas observaciones sobre cada determinación realizada, y se concluye la presentación de resultados con el análisis estadístico de datos experimentales.

## RESULTADOS

### 4.1.- DETERMINACIONES REALIZADAS EN SUERO

#### 4.1.1.- GLUCOSA

Apesar de que la concentración de glucosa no alcanzó el nivel basal o control (  $132.28 \pm 5.96$  mg/dl, media  $\pm$  desv.est.), éste fue disminuído significativamente del estado diabético (  $383.0 \pm 62.97$  ) por los tratamientos preliminares de espermina (50 mg/kg) a 218 mg/dl vía oral, y 229 mg/dl vía intraperitoneal.

Con espermidina , en los tratamientos preliminares (100 mg/kg) vía oral, se logró una disminución de la glucosa hasta 248 mg/dl, recuperación que no se observó con las concentraciones de 100 mcg/kg y 50 mg/kg vía oral e intraperitoneal, respectivamente.

VER GRAFICAS DE GLUCOSA-COMPARACION DE TRATAMIENTOS

En los grupos diabéticos tratados con las poliaminas putrescina y espermina, se disminuyó la glucosa del estado diabético hasta  $253.67 \pm 76.97$  mg/dl y  $199.84 \pm 62.57$ , respectivamente.

El grupo diabético tratado con espermidina permaneció en una marcada hiperglucemia ( $415.41 \pm 73$  mg/dl).

VER TABLA I Y GRAFICA DE GLUCOSA EN SUERO

#### 4.1.2.- $\alpha$ -AMILASA

La actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa se encontró disminuída en un 24% en el grupo diabético en relación con el grupo control.

En el caso de los grupos diabéticos tratados con putrescina y espermidina, la recuperación hasta niveles basales fue del 100% e incluso superior.

VER GRAFICA DE ACTIVIDAD DE  $\alpha$ -AMILASA EN SUERO.

Para el grupo con pretratamiento de espermina la actividad de la enzima se vió disminuída en un 13% con respecto al control (de  $906.49 \pm 59.34$  U/L a  $787.26 \pm 96.56$ ).

#### 4.1.3.- TRIGLICERIDOS

La concentración de triglicéridos en suero se vió incrementada al doble en las ratas del grupo diabético (de  $44.57 \pm 24.71$  mg/dl a  $90.23 \pm 42.93$ ).

El pretratamiento con las tres poliaminas utilizadas sobre ratas diabéticas permitió la recuperación de los niveles basales, observándose que en el grupo pretratado con espermina la concentración disminuyó hasta  $31.83 \pm 8.76$  mg/dl.

VER GRAFICA DE TRIGLICERIDOS EN SUERO

#### *4.1.4.- PROTEINAS*

Los valores obtenidos en este parámetro en todos los grupos estudiados no presentan diferencias significativas entre sí, sin embargo en el grupo diabético pretratado con putrescina se observa la recuperación al nivel basal.

#### *4.1.5.- ACTIVIDAD DE ARGINASA*

La actividad de arginasa sérica se vió notablemente incrementada en el grupo diabético, 3.22 veces más en relación con el grupo control.

En el grupo diabético pretratado con putrescina, el aumento en la actividad de la enzima fue de hasta 5.46 veces, y en los otros grupos también se observó un incremento notable. El grupo pretratado con espermina presentó un valor similar al del grupo diabético.

VER GRAFICA DE ACTIVIDAD DE ARGINASA EN SUERO

#### *4.2.- DETERMINACIONES EN TEJIDO PANCREATICO*

##### *4.2.1.- PESO SECO*

En el grupo diabético se observó una disminución en la cantidad de masa pancreática, con respecto al grupo control; el mismo caso se presentó en el grupo pretratado con espermina.

Para los grupos pretratados con putrescina y espermidina no se observa diferencia significativa en relación al grupo control.

#### 4.2.2.- ACTIVIDAD DE ARGINASA EN HOMOGENIZADO

La actividad de arginasa se vió notablemente incrementada en los grupos de pretratamiento con poliaminas, particularmente con espermina, en relación con el grupo diabético en el cual disminuyó.

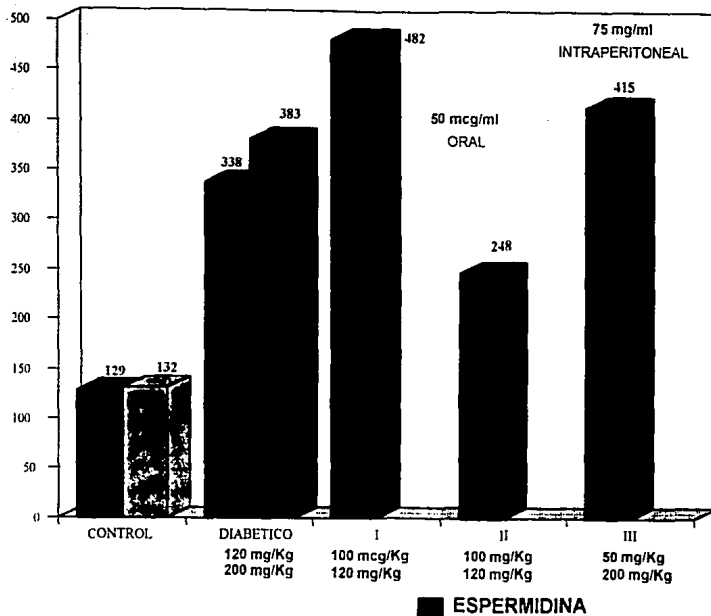
En los grupos diabéticos pretratados con putrescina y espermidina, el incremento con respecto al grupo diabético fue del doble.

#### 4.2.3.- PROTEINAS

Con respecto al grupo control se detectó una disminución en la concentración de proteína total, de  $0.53 \pm 0.08$  mg/mg peso seco a  $0.49 \pm 0.09$  en el grupo diabético.

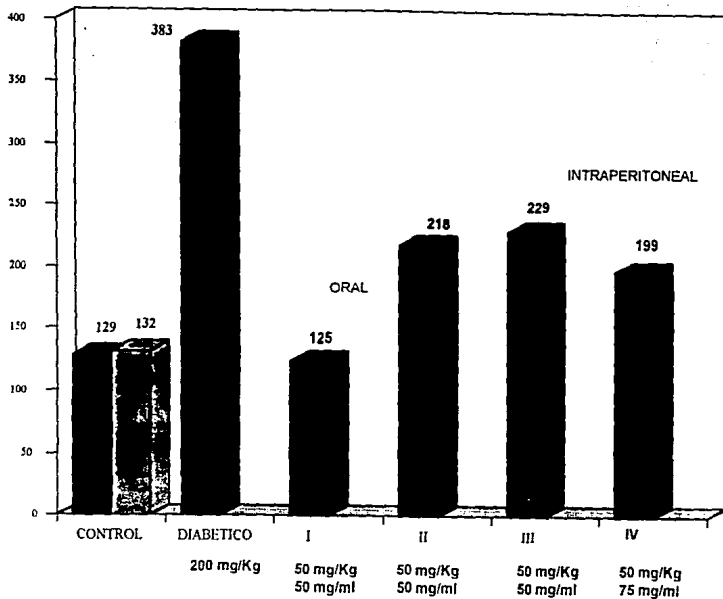
En el caso de los grupos de pretratamiento no se observó recuperación hacia el nivel basal.

# GLUCOSA (mg/dl) COMPARACION DE TRATAMIENTOS





# GLUCOSA (mg/dl) COMPARACION DE TRATAMIENTOS



■ ESPERMINA

TABLA I

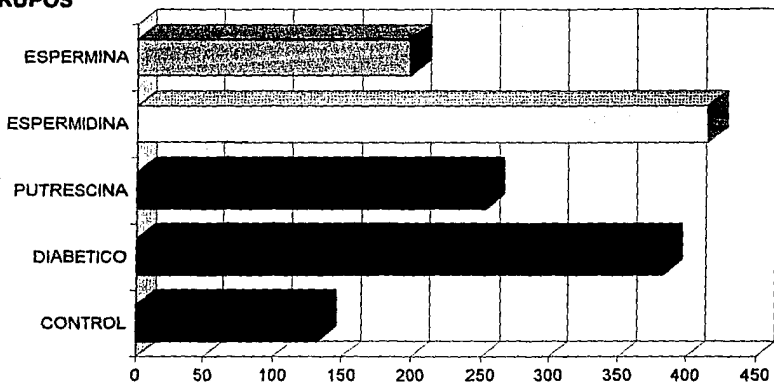
		GRUPO CONTROL		GRUPO DIABETICO		GRUPOS DIABETICOS TRATADOS CON POLIAMINAS					
		MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	PUTRESCINA		ESPERMIDINA		ESPERMINA	
						MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR
<b>PESO</b>	Inicial	313.46	-	353.71	17.4	315.27	18.71	334.42	17.97	330.28	23.18
	Final			330.01	21.94	305.87	21.17	312.84	17.54	312.55	27.27
	Diferencia			20.7	9.49	9.4	8.44	21.58	12.04	17.73	9.98
<b>DETERMINACIONES EN SUERO</b>											
	Glucosa ( mg / dL )	132.28	5.96	383	62.97	253.67	76.97	415.41	73	199.84	62.57
	Amilasa ( U / L )	906.49	59.34	689.79	103.69	1522.1	147.16	1005	75.54	787.26	96.56
	Triglicéidos ( mg / dL )	44.57	24.71	90.22	42.93	39.22	15.67	43.26	9.53	31.83	8.76
	Proteínas ( g / dL )	7.18	1.03	6.3	0.63	7.1	0.85	6.05	0.59	6.07	0.47
	Urea Basal ( mg / dL )	35.48	4.87	145.62	82.6	293.45	32.43	236.53	68.96	62.08	30.74
	Arginasa ( mg urea / dL )	56.98	8.54	183.53	111.94	310.98	32.18	267.78	86.33	197.37	61.88
<b>DETERMINACIONES TEJIDO PANCREATICO</b>											
	Peso seco ( mg ph / mg ps )	5.48	0.54	6.78	0.77	5.45	0.48	5.18	0.62	7.61	0.6
	Peso seco ( mg ps / mg ph )	0.18	0.02	0.15	0.02	0.18	0.02	0.19	0.02	0.13	0.01
	Proteínas ( mg / mg ps )	0.53	0.08	0.49	0.09	0.18	0.02	-0.19	0.02	0.14	0.03
	Urea basal ( umol urea / mg prot * min )	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
	Arginasa ( umol urea / mg prot * min )	0.16	0.05	0.05	0.03	0.1	0.02	0.1	0.02	0.19	0.04

\* La diabetes se indujo inyectando aloxana i.v. en dosis de 200 mg/kg.

\* Las poliaminas fueron administradas en concentraciones de 75 mg/ml i.p. previo a la dosis de aloxana.

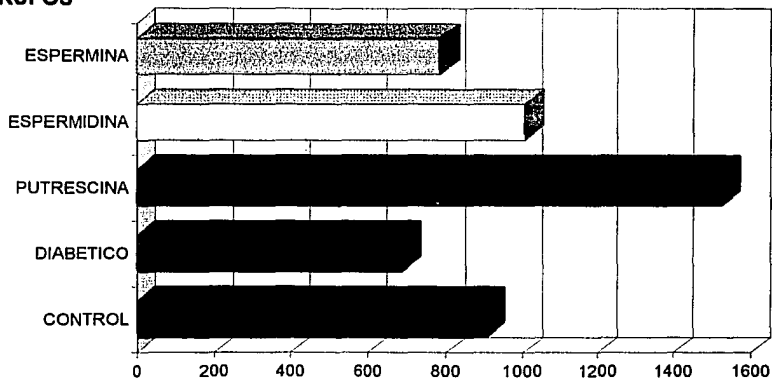
### GLUCOSA EN SUERO (mg/dl)

#### GRUPOS



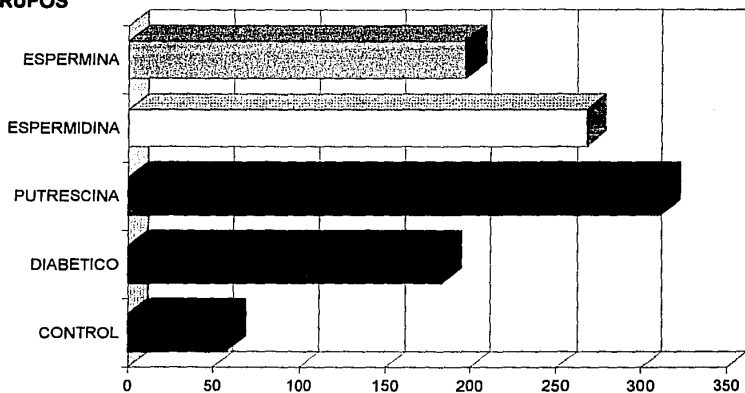
## ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA EN SUERO (U/L)

### GRUPOS



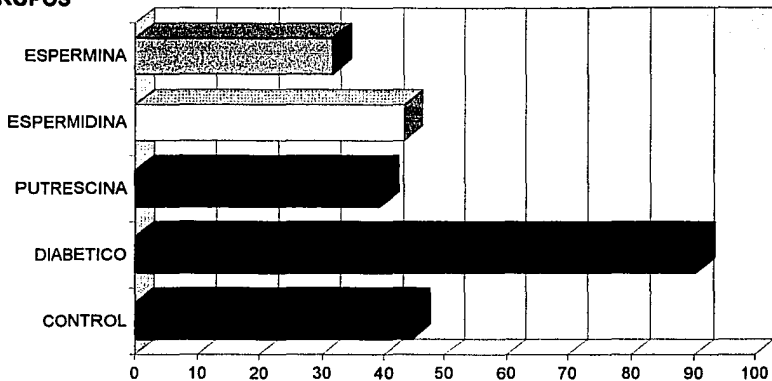
## ACTIVIDAD DE ARGINASA EN SUERO (mg urea/dl)

### GRUPOS



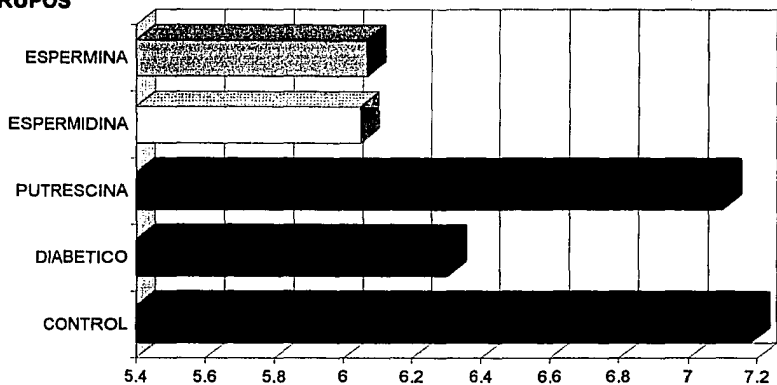
## TRIGLICERIDOS EN SUERO (mg/dl)

### GRUPOS



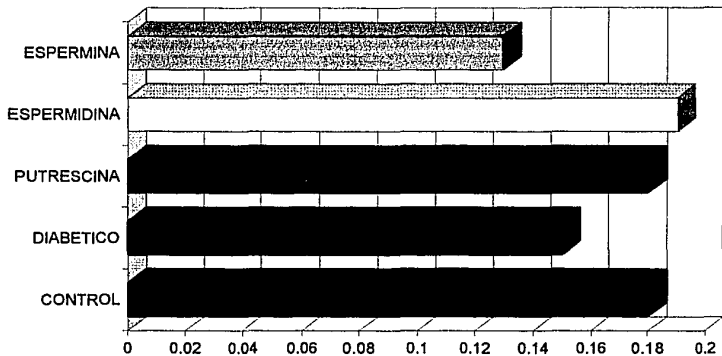
### PROTEINAS EN SUERO (g/dl)

#### GRUPOS



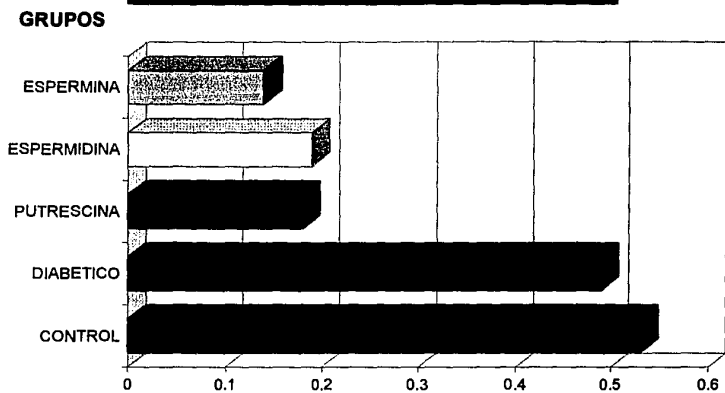
**PESO SECO (mg ps/ mg ph)**

**GRUPOS**





### PROTEINAS EN TEJIDO PANCREATICO (mg/ mg ps)



**ACTIVIDAD DE ARGINASA EN TEJIDO PANCREATICO**  
( $\mu\text{mol urea/mg prot} \cdot \text{min}$ )

**GRUPOS**

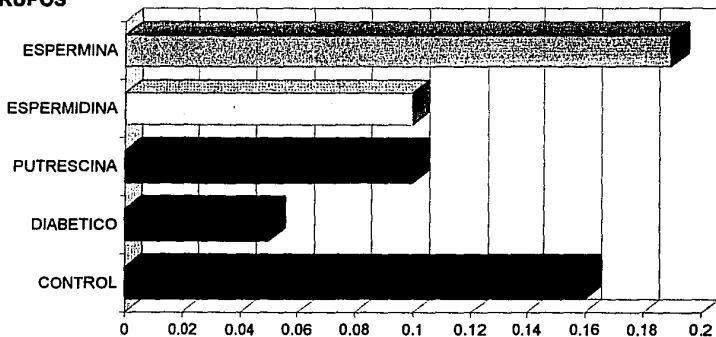


TABLA II

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS EXPERIMENTALES

MODELO Análisis de varianza de una vía (ANOVA)

	COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS**			
	DIABÉTICO vs CONTROL	DIABET. TRATADO CON PUTRESCINA vs CONTROL	DIABET. TRATADO CON ESPERMIDINA vs CONTROL	DIABET. TRATADO CON ESPERMINA vs CONTROL
	p*	p*	p*	p*
<b>DETERMINACIONES EN SUERO</b>				
Glucosa	< 0 001	< 0 001	< 0 001	< 0 01
Amilasa	< 0 001	< 0 001	< 0 01	< 0 01
Triglicéidos	< 0 01	> 0 1	> 0 1	> 0 1
Proteínas	0 014	> 0 1	< 0 01	0 015
Arginasa	< 0 01	< 0 001	< 0 001	< 0 001
<b>DETERMINACIONES TEJIDO PANCREÁTICO</b>				
Peso seco	< 0 001	> 0 1	> 0 1	< 0 01
Proteínas	> 0 1	< 0 001	< 0 001	< 0 001
Arginasa	< 0 001	< 0 01	< 0 01	0 07

\* p < 0 01 (Distribución normal 95% límites de confianza de diferencia)

\*\* SE COMPARARON TODOS LOS GRUPOS ENTRE SI GRUPO DIABÉTICO CONTRA GRUPO CONTROL, GRUPOS TRATADOS CON POLIAMINAS CONTRA DIABÉTICO SIN TRATAMIENTO Y GRUPOS TRATADOS CON POLIAMINAS ENTRE SI

TABLA III

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS EXPERIMENTALES

MODELO: Análisis de varianza de una vía (ANOVA)

	COMPARACION ENTRE GRUPOS*		
	DIABET. TRATADO CON PUTRESCINA vs DIABET. SIN TRATAMIENTO	DIABET. TRATADO CON ESPERMIDINA vs DIABET. SIN TRATAMIENTO	DIABET. TRATADO CON ESPERMINA vs DIABET. SIN TRATAMIENTO
	p	p	p
<b>DETERMINACIONES EN SUERO</b>			
Glucosa	< 0.001	> 0.1	< 0.001
Amilasa	< 0.001	< 0.001	0.015
Triglicéridos	< 0.001	< 0.01	< 0.001
Proteínas	< 0.01	> 0.1	> 0.1
Arginasa	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<b>DETERMINACIONES TEJIDO PANCREÁTICO</b>			
Peso seco	< 0.01	< 0.01	> 0.1
Proteínas	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Arginasa	< 0.001	< 0.001	< 0.001

\* p < 0.01 (95% límites de confianza de diferencia).

TABLA IV

ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS EXPERIMENTALES

MODELO: Análisis de varianza de una vía (ANOVA)

	COMPARACION ENTRE GRUPOS*		
	DIABET. TRATADO CON PUTRESCINA vs DIABET. TRATADO CON ESPERMIDINA	DIABET. TRATADO CON PUTRESCINA vs DIABET TRATADO CON ESPERMINA	DIABET. TRATADO CON ESPERMIDINA vs DIABET TRATADO CON ESPERMINA
	p	p	p
<b>DETERMINACIONES EN SUERO</b>			
Glucosa	< 0.001	0.05	< 0.001
Amilasa	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Triglicéridos	> 0.1	0.09	< 0.01
Proteínas	< 0.01	< 0.01	> 0.1
Arginasa	> 0.1	< 0.001	0.02
<b>DETERMINACIONES TEJIDO PANCREATICO</b>			
Peso seco	> 0.1	< 0.01	< 0.01
Proteínas	> 0.1	< 0.001	< 0.001
Arginasa	> 0.1	< 0.001	< 0.001

\* p < 0.01 (95% límites de confianza de diferencia).

## 5 DISCUSION DE RESULTADOS

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### 5.1.- TRATAMIENTOS UTILIZADOS

Previo al desarrollo experimental del modelo descrito para este trabajo, fue necesario realizar una comparación de tratamientos entre las poliaminas a utilizarse, la dosis de aloxana adecuada y dos diferentes formas de administración de las poliaminas, oral e intraperitoneal.

Se evaluó el estado diabético de lotes con una concentración mayor de aloxana en tiempos de acción reducidos, comparándose los resultados obtenidos en modelos experimentales anteriores que utilizaron dosis de aloxana de 120 mg/kg durante 96 hrs., y los resultados del presente trabajo con aloxana en dosis de 200 mg/kg durante 24 horas.

#### 5.1.1.- ALOXANA

Para producir diabetes experimental en animales, se han utilizado básicamente dos sustancias, la estreptozotocina y la aloxana. La primera daña las células  $\beta$  más lentamente y se han observado efectos tóxicos en otros tejidos, particularmente el riñón. En algunos pacientes que la han recibido se ha detectado la ausencia de hiperglucemia, lo cual sugiere que las células  $\beta$  de hombre son relativamente más resistentes.

La aloxana bloquea la liberación de insulina estimulada por la glucosa antes de la destrucción de las células  $\beta$ , y se ha descrito como selectiva de modo que disminuyen las posibilidades de que interfiera con la acción de otros órganos.

Por estas razones se decidió utilizar aloxana como inductor de la diabetes experimental en este estudio.

Por otra parte, la dosis elegida de aloxana se estableció teniendo como antecedente la concentración normalmente utilizada en experimentos con animales (100 - 200 mg/kg), en los cuales se comprueba el estado de hiperglucemia característico; y con base en pruebas dosis-tiempo de respuesta de forma tal que se disminuyeran los tiempos experimentales de 96 hrs con una dosis de 120 mg/kg a 24 horas con 200 mg/kg.

#### 5.1.2.- POLIAMINAS

La dosis de cada poliamina utilizada se unificó a 50 mg/kg de peso, partiendo de una solución de 75 mg/ml administrada 1 hr antes de inducir la diabetes.

Se utilizaron como antecedente diferentes estudios, algunos realizados con espermina (1 mg/kg) para evaluar el daño hepático producido por la administración de tetracloruro de carbono; y otros experimentos en los que se utilizaron poliaminas vía oral contra el daño gástrico inducido por etanol acidificado en ratas. (9,33,43)

Además, se contaba con antecedentes del efecto de diferentes poliaminas (5 mg/kg) sobre la función pancreática en ratas diabéticas por aloxana. (14)

Las modificaciones en la concentración de tratamiento se realizaron de acuerdo con pruebas dosis-respuesta debido a los tiempos reducidos de estudio, y por la disponibilidad del material biológico en cuanto a sexo y peso.

Por otra parte, inicialmente se administraba el pretratamiento de poliaminas vía oral de acuerdo con los antecedentes mencionados anteriormente, en los que se administraban poliaminas oralmente para proteger a la mucosa gástrica del daño producido por etanol acidificado.

Se decidió cambiar la vía de administración a intraperitoneal debido a que resulta experimentalmente más fácil controlar a las ratas y aplicarles una inyección que asegura que la cantidad de poliamina administrada es constante y reproducible, además de que la absorción de las poliaminas en el tejido pancreático se lleva a cabo de manera más directa y rápida, evitando pérdidas de algún tipo.





## 5.2.-PARAMETROS ANALIZADOS

### 5.2.1.- DETERMINACIONES REALIZADAS EN SUERO

#### 5.2.1.1.- GLUCOSA

La variación en la concentración de glucosa entre el grupodiabético y el grupo control, 2.89 veces mayor en el primero, confirma un estado evidente de hiperglucemia causado por la falta de insulina que ya no es producida por las células  $\beta$  del páncreas.

La hiperglucemia se hizo permanente debido a que la selectividad de la aloxana causó la necrosis de las células productoras de insulina en tan sólo 24 horas. Lo anterior es indicativo de que la concentración de aloxana utilizada es probablemente demasiado elevada como para permitir una recuperación total hasta el nivel basal de la concentración de glucosa, por medio del pretratamiento con poliaminas.

Sin embargo, en los grupos de ratas pretratados con putrescina y espermina sí se observó el efecto protector esperado sobre el tejido pancreático debido a que, se evitó la elevación de la concentración de glucosa hasta los niveles del grupo diabético.

En el grupo diabético pretratado con espermidina no se observó diferencia significativa en comparación con el grupo diabético para el nivel de glucosa. Podría suponerse que el daño pancreático que produce una dosis tan alta de aloxana interfiere con las vías metabólicas favorecidas por las otras poliaminas probadas, como participantes en la biosíntesis de insulina o interviniendo directamente sobre el metabolismo de la glucosa en el tiempo de acción establecido por el modelo experimental de este trabajo.

Posiblemente, con mayor tiempo de acción de las poliaminas sobre el tejido pancreático dañado por causa de la aloxana, los niveles de glucosa disminuirían hasta el estado basal o próximos a éste y se podría apreciar mejor la acción de las tres poliaminas probadas. Además, es probable que las concentraciones de cada poliamina probada no sean las ideales debido a que, en el caso de los grupos en que se utilizaron putrescina y espermina en los que sí hubo evidencia de una recuperación del tejido pancreático, ésta pudo haber sido mayor si la concentración utilizada se hubiera incrementado al doble por ejemplo.

#### 5.2.1.2 .- ACTIVIDAD DE $\alpha$ - AMILASA

Apesar de que la bibliografía señala que la aloxana se considera destructor selectivo de las células  $\beta$  pancreáticas, al igual que en estudios anteriores, se decidió incluir la medición de la actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa en suero. Esto se realizó con el objeto de descubrir si en las condiciones propuestas por el presente trabajo en las que el tratamiento con poliaminas es anterior al daño ocasionado por la aloxana, se observa la recuperación hacia niveles basales de la actividad de la enzima; considerándose que en experimentos anteriores con diferente modelo el control de esta función exocrina del páncreas sí se ve disminuido en grupos diabéticos.

Una posible razón por la cual la actividad de la  $\alpha$ -amilasa se vea disminuida en el grupo diabético es que esta enzima interviene en la hidrólisis del almidón para producir  $\alpha$ -dextrinas,  $\alpha$ -maltosa y  $\alpha$ -glucosa. En ratas diabéticas el contenido de  $\alpha$ -glucosa es elevado por lo que la enzima que cataliza su producción puede disminuir su actividad al tener en exceso el producto que ella forma.

En todos los grupos de pretratamiento con poliaminas se observó que la actividad de la  $\alpha$ -amilasa aumentó con respecto al grupo diabético y con tendencia al estado basal e incluso a niveles mayores. Esto es muy comprensible si se piensa que las poliaminas asumieron un papel muy similar al de la insulina, favoreciendo el metabolismo de los carbohidratos, aumentando la oxidación de la glucosa.

Además, no debe omitirse la posibilidad de que existió regeneración de los acinos pancreáticos.

### 5.2.1.3.- TRIGLICERIDOS

En el caso del grupo diabético, por la ausencia de insulina secretada por las células  $\beta$  del páncreas que se encuentran destruidas, se activa en los adipocitos una enzima, la lipasa hormosensible. Esta propicia el desdoblamiento de los ácidos grasos almacenados en los adipocitos a triglicéridos y glicerol principalmente, con su posterior liberación al torrente sanguíneo por lo cual aumenta su concentración en la sangre.

No ocurre lo mismo en los grupos de pretratamiento con poliaminas en los que se observó que la concentración de los triglicéridos en suero disminuyó con respecto al grupo diabético, con tendencia al estado basal e incluso a niveles menores.

Nuevamente, esto es comprensible si se piensa que con el pretratamiento de las poliaminas de alguna forma se intervino en el metabolismo de los ácidos grasos evitando la liberación de triglicéridos y propiciando su almacenamiento en los adipocitos, por lo que los niveles de triglicéridos en suero disminuyeron.

#### 5.2.1.4.-PROTEINAS

La concentración de proteínas en suero para el grupo diabético disminuyó con respecto al grupo control, aunque sin una diferencia muy significativa. Sin embargo para el caso del grupo pretratado con putrescina si se observó el comportamiento de reestablecer el nivel basal. Esto puede deberse a que la putrescina favorece de una manera más directa o sencilla la síntesis de proteínas y en su caso la dosis fue más acertada que en las poliaminas restantes.

#### 5.2.1.5.-ACTIVIDAD DE ARGINASA

La actividad de arginasa en suero se ve incrementada en algunos tipos de enfermedades (principalmente hepáticas) y daños tisulares, por ser una enzima que interviene en la formación de diversos compuestos que en cierta forma favorecen la regeneración celular, y son transportados a través del suero hasta los sitios en que se involucran en vías metabólicas más complejas. Este es el caso observado en el grupo diabético .

En los grupos de tratamiento con poliaminas se ve un aumento muy significativo de la actividad de arginasa con respecto al grupo control y también al grupo diabético. Esto quizás sea debido a que de la misma manera que la insulina estimula algunas reacciones metabólicas para la síntesis y/o el almacenamiento de ciertas sustancias, entre ellas, las proteínas, las poliaminas estimulan también vías anabólicas.

## 5.2.2.- DETERMINACIONES REALIZADAS EN TEJIDO PANCREATICO

### 5.2.2.1.- P E S O S E C O

Este resultado obtenido del estudio propuesto, adicionalmente a los resultados observados en las determinaciones en suero, es indicativo de que sí existe cierta recuperación general del daño ocasionado por la aloxana sobre el tejido pancreático.

Se observa que en los grupos tratados con putrescina y espermidina existe una clara tendencia a la recuperación de la masa total del páncreas del grupo control. Este efecto se debe a la participación de las poliaminas en la síntesis de proteínas y específicamente a su relación con procesos de crecimiento y diferenciación celular.

### 5.2.2.2.- P R O T E I N A S

Los resultados observados con respecto a esta determinación parecen contradictorios en los grupos de tratamiento con poliaminas. En éstos, se esperaba una recuperación del nivel de proteínas hacia el nivel basal claramente disminuido en el estado diabético.

Una posible explicación a estos resultados puede encontrarse relacionada con el tiempo de acción de las poliaminas sobre el tejido pancreático.

Se puede considerar en cierta forma que el tiempo fue reducido como para permitir la rápida regeneración tisular, sobre un daño tan severo como el que se consiguió con la aloxana.

Cabe mencionar que, es factible también algún error en la metodología de la determinación de proteínas en tejido que no se haya considerado y lamentablemente pasó inadvertido reflejando los resultados anteriormente expuestos.

### 5.2.2.3.-ACTIVIDAD DE ARGINASA

Como es de suponerse, la actividad de la enzima arginasa, en el estado diabético es reducida notablemente debido a la destrucción celular ocasionada por la acción de la aloxana. La sensibilidad de esta enzima frente a un desequilibrio general del organismo se refleja en la disminución de su actividad, la cual se ve recuperada significativamente en los grupos de pretratamiento con poliaminas, y especialmente en el grupo en que se utilizó espermina.

Es claro que las poliaminas además de promover el transporte de la glucosa y por lo tanto contribuir a regularizar el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos, están además favoreciendo la síntesis de proteínas y disponibilidad de aminoácidos libres.

La utilización inmediata de las poliaminas administradas, al momento de inducir la diabetes con la aloxana, da lugar a la disminución de las mismas por su metabolismo acelerado para tratar de proteger al tejido dañado. Esto desencadena una actividad intensa de la arginasa y seguramente de muchas enzimas más, para contribuir por una parte a la síntesis de diversas proteínas, y por otra para regular probablemente las fases iniciales de la síntesis de poliaminas como se ha señalado en estudios anteriores.

## 6 CONCLUSIONES

\* Si existe un efecto citoprotector sobre el tejido pancreático dañado con la aloxana ya que se observó una tendencia general hacia el estado basal en los diferentes parámetros bioquímicos analizados en los grupos de pretratamiento con poliaminas.

\* A pesar de que la recuperación en algunas determinaciones no fue total, se puede afirmar que en diferente magnitud, las poliaminas juegan un papel similar al de la insulina.

\* Las poliaminas intervienen en el metabolismo de la glucosa ya que actúan rápidamente para disminuir su concentración en la sangre.

\* Las poliaminas estimulan el metabolismo de los lípidos porque favorecen el almacenamiento de los triglicéridos en el tejido adiposo inhibiendo su catabolismo.

\* Las poliaminas propician la regeneración del tejido pancreático y pueden estar relacionadas con la biosíntesis de insulina ya que la actividad de la enzima arginasa, que interviene en la formación de diversos compuestos, principalmente aminoácidos; se ve incrementada significativamente en los grupos de pretratamiento con poliaminas.

\* Del grupo de poliaminas probadas, la putrescina es la que ofrece el mejor efecto citoprotector sobre el tejido pancreático. La espermidina le sigue en orden de efectividad y en el caso de la espermina no se obtuvieron los resultados esperados.



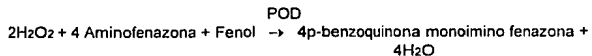
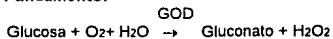
## APENDICE

### A.1 TECNICAS EMPLEADAS

#### A.1.1. GLUCOSA

Prueba enzimática colorimétrica. Test-Combinación Glucosa GOD-PAP. Lakeside.

**Fundamento:**



**Reactivos:**

1. Estándar de glucosa 100 mg/dl.
2. Fenol
3. Amortiguador/Enzimas/4-Aminofenazona

**Equipo:**

- Centrífuga
- Colorímetro
- Baño de temperatura controlada
- Pipetas de precisión

**Procedimiento:**

Todas las determinaciones se hacen por duplicado frente a un blanco y un estándar.

Se mezclan 20 mcg de suero con 2 ml de la mezcla de reacción (reactivos 2 y 3), y se mantiene en baño de temperatura controlada a 37°C/10 min. protegiéndose de la luz. Se anota la absorbancia a 470-560 nm a 20-25°C en un lapso no mayor de 15 minutos posteriores a la incubación.

**Cálculos:**

$$c = 100 \times \frac{\text{Lectura prueba} - \text{Lectura blanco}}{\text{Lectura estándar} - \text{Lect. blanco}} = \text{mg/dl}$$

$$c = 5.55 \times \frac{\text{Lectura prueba} - \text{Lectura blanco}}{\text{Lectura estándar} - \text{Lect. blanco}} = \text{mmol/l}$$

donde **c** es la concentración de glucosa en suero.

**Observaciones :**

El reactivo 2 contiene azida de sodio como conservador.

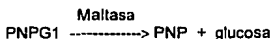
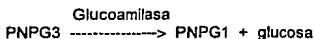
Evitar el contacto con la piel o las mucosas. La ingestión de grandes dosis puede provocar vasodilatación y descenso de la presión sanguínea.

**A.1.2.  $\alpha$  - AMILASA**

Prueba enzimática colorimétrica. Reactivo para  $\alpha$ -amilasa GILFORD SYSTEMS .CIBA-CORNING.

**Fundamento:**

La  $\alpha$ -amilasa cataliza la hidrólisis de la p-nitrofenil maltoheptaosida bloqueada (PNPG7 bloqueada). El grupo bloqueador de la PNPG7 inmuniza el sustrato contra la descomposición por medio de las dos enzimas auxiliares que contiene el reactivo, pero no por la  $\alpha$ -amilasa. Una de las enzimas auxiliares, la glucoamilasa, hidroliza los productos de la reacción de la amilasa y otra, la maltasa ( $\alpha$ -glucosidasa), cataliza la liberación del p-nitrofenilato (PNP). El índice de producción de PNP observado a 405 nm, es proporcional a la actividad de la amilasa en la muestra.

**Reactivos:**

## 1.Solución con:

- PNPG7 bloqueada
- Cloruro de sodio
- Cloruro de calcio
- Maltasa ( $\alpha$  - glucosidasa)
- Glucoamilasa
- Amortiguador (Buffer pH 7.0)
- Azida de sodio

**Equipo:**

- Pipetas de precisión
- Cronómetro
- Espectrofotómetro
- Baño de temperatura controlada

**Procedimiento:**

- Longitud de onda: 405 nm
- Temp. de Reacción: 37°C
- Tiempo de lectura: 60 seg.
- Modalidad: Absorbancia
- Tiempo de incubación: 60 seg.

Se mezcla 1 ml de reactivo para  $\alpha$ -amilasa con 0.040 ml de muestra y después del período de incubación se anota la lectura de absorbancia a 405 nm ( $A_0$ ), y se hace otra lectura transcurrido 1 minuto ( $A_1$ ).

Las determinaciones se realizan por duplicado frente a un blanco.

**Cálculos:**

La actividad de la  $\alpha$ -amilasa puede expresarse usando la Unidad Internacional (la cantidad de la enzima que cataliza la transformación de 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto bajo condiciones definidas).

$$\alpha\text{-amilasa actividad (U/L)} = \frac{A/\text{min} \times 10^6 \times 1.04}{(8.9 \times 10^3) \times 1 \times 0.04} \rightarrow A/\text{min} \times 2921$$

donde:

A=incremento en absorbancia a 405 nm

min=minuto

$8.9 \times 10^3$  = absorbancia molar de PNF a 405 nm y 37°C

$(8.9 \times 10^3 \text{ litros} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})^6$

$10^6$ =factor de conversión de moles a mmoles

l=recorrido de la luz en cm

1.04=volumen total de reacción en ml

0.04=volumen de la muestra en ml

#### **Observaciones:**

Debido a que la amilasa requiere calcio, los anticoagulantes fijadores de calcio tales como EDTA y el citrato de sodio inhibiran la actividad de la amilasa y causarán resultados falsamente bajos.

No se debe pipetear directamente con la boca el reactivo por ser susceptible a la contaminación con la amilasa salival.

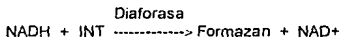
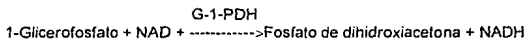
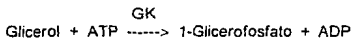
#### **A.1.3. TRIGLICERIDOS**

Prueba enzimática colorimétrica. Reactivo para triglicéridos GILFORD SYSTEMS.CIBA-CORNING.

#### **Fundamento:**

El glicerol producido por hidrólisis enzimática de triglicéridos es fosforilado por adenosina-trifosfatasa (ATP) para producir 1-glicerofosfato y ADP en la reacción catalizada por gliceroquinasa (GK). El glicerofosfato-dehidrogenasa

(G-1PDH) cataliza la oxidación del 1-glicerofosfato en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) para producir NADH que es usado para reducir la anilina de cloruro de 2-tetrazolio (iodofenil-p)-3-(nitrofenil-p)-5-fenil (INT) a formazan en la reacción catalizada por diaforasa. El formazan absorbe la luz a 500 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glicerol y por tanto, a la concentración de triglicéridos. Esta técnica de Gilford es una modificación de la metodología de Wahlefeld.



#### Reactivos:

Compuestos que forman el reactivo reconstituido:

- ATP
- NAD
- INT
- GK (microbiana)
- G-1-PDH (músculo de conejo)
- Diafora ( Cl. Kluveri)
- Lipasa (microbiana)
- Amortiguador pH 7.7

**Equipo:**

- Pipetas de precisión
- Cronómetro
- Espectrofotómetro

**Procedimiento:**

- Longitud de onda: 500 nm
- Temp. de Reacc.: Ambiente (18-25°C)
- Tiempo de reacción: 18-30 min.
- Modalidad: Absorbancia

Se mezclan 10 ml de la muestra con 1 ml del reactivo reconstituido y en un tiempo de 18-30 min se anota la absorbancia.

Las determinaciones se realizan por duplicado frente a un blanco y con un calibrador o estándar.

**Cálculos:**

$$c = \frac{\text{Abs.muestra} - \text{Abs.blanco}}{\text{Abs.calib.} - \text{Abs.blanco}} \times \text{Concentración calibrador mg/dl}$$

donde:

Concentración calibrador= 500 mg/dl (5.65 mmol/L)

**NOTA:** La molaridad es determinada usando el peso molecular de los triglicéridos como 885 g/mol.

#### A.1.4. PROTEINAS

Método de Lowry modificado con el reactivo de Folin-Ciocalteu.(1)

##### **Fundamento:**

El color que produce el reactivo de Folin-Ciocalteu se debe a la reacción de la proteína con una solución alcalina de cobre y a la reducción del fosfomolibdato - fosfotungstato del reactivo por la proteína tratada.

La modificación del método de Lowry para la determinación de proteínas con el reactivo de Folin proporciona gran sensibilidad (5 mcg de proteína) y simplicidad en el procedimiento.

##### **Reactivos:**

A.Solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en  $\text{NaOH}$  0.10 N.

B.Solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5% en tartrato de sodio o potasio al 1%.

C.Solución cupro-alcalina. Mezcla de 50 ml del reactivo A con 1 ml del reactivo B.

D.Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido.

##### **Equipo:**

-Vórtex.

-Colorímetro.

-Baño de temperatura controlada a 37°C.

-Centrifuga.



### **Procedimiento:**

Se toma la alícuota de la muestra una vez procesada y se completa el volumen a 0.5 ml.

Se adicionan 2 ml de la sol. C, se mezclan y se deja reposar por 10 min. Se añaden 0.2 ml del reactivo diluido de Folin, se mezcla y se deja reposar por 20 min. después de los cuales se lee la absorbancia a 530 nm.

Las determinaciones se realizan por duplicado frente a un blanco y con un estándar.

### **Cálculos:**

Se realiza una curva estándar o control de concentración vs. absorbancia utilizando albúmina bovina, y con la lectura de absorbancia de cada determinación se obtiene la concentración correspondiente para cada muestra.

Posteriormente se relaciona el tratamiento a que fue sometida la muestra y se obtiene una concentración real final.

### **PROTEINA EN SUERO**

Tratamiento de la muestra:

Dil. 1:10 -----> Tomar 10 mcl

⇒ Suero original = 1 mcl

De la lectura de absorbancia:

Abs muestra - Abs. blanco = Abs/Conc.

⇒ mcg / mcl y expresar como mg/dl

1 dl = 100 ml

**Observaciones:**

Preparar reactivos al momento de la determinación para evitar su degradación (principalmente oxidación).

- Manejar con precaución el reactivo de Folin evitando su ingestión o contacto con la piel.

**A.1.5. PESO SECO**

Determinación rápida del peso seco por colorimetría.(2)

**Fundamento:**

El método consiste en hacer reaccionar muestras biológicas con una solución ácida de dicromato de potasio con el fin de oxidar al máximo la materia orgánica contenida en la muestra, la cual es proporcional a la intensidad del color obtenido.

**Reactivos:**

1.Solución de dicromato de potasio al 2% en ácido sulfúrico concentrado.

2.Solución estándar de manitol de 2mg/ml.

**Equipo:**

- Vórtex.
- Colorímetro.

**Procedimiento:**

Se toma una alícuota de 50 µl de muestra y se completa a 1 ml con agua destilada. Se agregan 2 ml de la solución de dicromato de potasio en ácido sulfúrico. Se mezcla, se deja enfriar y se lee la absorbancia a 660 nm.

Las determinaciones se realizan por duplicado frente a un blanco y con un estándar.

**Cálculos:**

La concentración de materia orgánica presente se expresa en:

$$\text{mcg de peso seco/ ml}$$

Se realiza una curva estándar o control de concentración vs. absorbancia utilizando manitol, y con la lectura de absorbancia de cada determinación se obtiene la concentración correspondiente para cada muestra.

Posteriormente se relaciona el tratamiento a que fue sometida la muestra y se obtiene una concentración real final.

$$\frac{\text{mcg}}{50 \text{ ml}} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \xrightarrow{\text{Fc}} \frac{\text{mg peso seco}}{\text{ml de homogenizado}}$$

donde:

Fc = factor que relaciona el peso del páncreas utilizado y la solución salina con la que se obtuvo el homogenizado.

**Observaciones:**

Este método tiene las ventajas de que requiere un mínimo de tiempo para la determinación, mayor sensibilidad, exactitud y precisión usando equipo estándar de laboratorio y es insensible a compuestos inorgánicos.

La única desventaja del método es que el dicromato reacciona específicamente con grupos que contienen carbono y, por lo tanto, la participación del nitrógeno u otros elementos en la composición del material biológico darán proporcionalmente menor absorbancia.

#### A 1.6. ARGINASA

Determinación de la actividad de arginasa, por medio de la cuantificación de urea producida en la hidrólisis de arginina. (3)

##### **Fundamento:**

La actividad de arginasa ha sido determinada por medición de:

1. Incremento de la concentración de arginasa.
2. Incremento en la concentración de ornitina.
3. Incremento en la concentración de urea.

Sin embargo, sólo algunos métodos son útiles para la medición de la actividad de arginasa en extractos de tejidos u homogenizados.

El método que utiliza el reactivo de tiosemicarbazida-diacetil monoxima-urea (TDMU) es el que presenta la ventaja de ser un método colorimétrico directo aplicable a homogenizados de tejido.

La aparición de color en este método es debida a la reacción de la urea formada con la tiosemicarbazida diacetil monoxima en medio ácido, y depende del tiempo y temperatura de calentamiento.

El tiempo requerido para el desarrollo máximo de color es dependiente de la temperatura, la intensidad de la reacción disminuye con el incremento del tiempo de calentamiento sobre 85°C, lo que indica que el producto es lábil a la temperatura.

**Reactivos:**

-Solución 1.- Reactivo colorido: Extracto acuoso de una solución que contiene tiousemicarbazida 2.4 mM y 2,3 butadiona monoxima 4.1 mM.

-Solución 2.- Reactivo ácido: 0.1 ml de cloruro de fierro III 0.12 M en ácido fosfórico al 56.7% y 100 ml de ácido sulfúrico al 20%.

-Solución 3.- Solución estándar de urea 15 mcg/ml.

**Equipo:**

- Parrilla eléctrica.

- Vórtex.

- Colorímetro.

**Procedimiento:**

Se toma una alícuota de 400 µl de muestra de homogenizado tratado para esta determinación y se completa un volumen de 1 ml. Se adiciona 1 ml del reactivo colorido y 2 ml del reactivo ácido. Se mezclan y cubren los tubos de ensayo para someterse a un calentamiento en baño de agua a 92°C por 25 minutos. Se deja enfriar por unos minutos y se lee absorbancia a 530 nm.

Las determinaciones se realizan por duplicado frente a un blanco y con un estándar para interpolar absorbancias vs. concentración en la curva estándar de urea realizada con anterioridad.

**Cálculos:**

La actividad de arginasa se expresa como:  $\frac{\text{mcg urea}}{\text{mcl/15'}}$

al relacionar la concentración con la absorbancia en la curva estándar de urea, y posteriormente se considera el tratamiento de la muestra de homogenizado y su relación con la concentración de proteína del tejido, por lo que se expresa finalmente como:

$$\frac{\text{mg urea}}{\text{mg prot. / min.}}$$

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. 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.
2. Bernal, A., Mández, J.D. y Rosado, A.: DETERMINACION RAPIDA DEL PESO SECO POR COLORIMETRIA, *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 12:83-88, 1981.
3. Geyer, J.W. and Dabich, D., RAPID METHOD FOR DETERMINATION OF ARGINASE ACTIVITY IN TISSUE HOMOGENATES, *Analytical Biochemistry* 39:412-417, 1971.
4. Kung, J.T., Brooks, S. B., Jakway, J.P., Leonard, L.L. & Talmage, D.W.: SUPPRESSION OF IN VITRO CYTOTOXIC RESPONSE BY MACROPHAGES DUE TO INDUCED ARGINASE, *J. Exp. Med.* 146:665-671, 1977.
5. Giles, K.W. and Myers, A., AN IMPROVED DIPHENYLAMINE METHOD FOR THE ESTIMATION OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID, *Nature* 206:93, 1965.
6. Robert, A., Guth, P., Schmidt, K.L. and Miller, T., RESPONSETO AN EDITORIAL ON GASTRIC CYTOPROTECTION, *Gastroenterology* 96, No. 2:548-551, 1989.
7. Steiner, D., Rauda, V. and Williams, R., SEVERE KETOACIDOSIS IN THE ALLOXAN DIABETIC RAT, *Endocrinology* 68:809-817, 1961.
8. Kozol, R., Fromm, D. and Ray, T.K., EFFECTS OF A NATURALLY OCURRING POLYAMINE ON ACID SECRETION BY ISOLATED GASTRIC MUCOSA (41765), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 175:52-57, 1984.
9. Mizui, T., Shimono, N. and Doteuchi, M., A POSSIBLE MECHANISM OF PROTECTION BY POLYAMINES AGAINST GASTRIC DAMAGE INDUCED BY ACIDIFIED ETHANOL IN RATS: POLYAMINE PROTECTION MAY DEPEND ON ITS ANTIPEROXIDATIVE PROPERTIES, *Japan J. Pharmacol.* 44: 43-50, 1987.
10. Loser, Chr., Folsch, U.R., Paprotny, C. & Creutzfeldt, W., POLYAMINES IN HUMAN GASTRIC AND ESOPHAGEAL CANCER, *Scand J. Gastroenterol.* 24:1193-1199, 1989.

11. Fitzpatrick, L., Gaginella, T., Haddox, M. and Johnson, L., PROSTAGLANDIN-MEDIATED TROPHIC EFFECTS ON THE RAT DUODENUM: THE ROLE OF POLYAMINES, Proc. Soc. Exp. Biol. and Medicine 189:201-205, 1988.
12. Hougaard, D., Nielsen, J.H. and Larsson, L., LOCALIZATION AND BIOSYNTHESIS OF POLYAMINES IN INSULIN-PRODUCING CELLS, Biochem. J. 238:43-47, 1986.
13. Morisset, J. and Benrezzak, O., POLYAMINES AND PANCREATIC GROWTH INDUCED BY CAERULEIN, Life Sciences 35:2471-2480, 1984.
14. Méndez, J.D. and Huerta, E., POLYAMINE EFFECTS ON PANCREATIC FUNCTION IN DIABETIC RATS, 15th International Congress of Biochemistry Jerusalem, Israel, 1991.
15. Mizunuma, T., Kawamura, S. and Kishino, Y., EFFECTS OF INJECTING EXCESS ARGININE ON RAT PANCREAS, J. Nutr. 114:467-471 1984.
16. Kitabchi, A., Duckworth, W. and Stentz F., INSULIN SYNTHESIS, PROINSULIN AND C PEPTIDES, Chapter 5:71-88.
17. Matschinsky, F., Pagliara, A., Zawalich, W. and Trus, M., METABOLISM OF PANCREATIC ISLETS AND REGULATION OF INSULIN AND GLUCAGON SECRETION, 76:935-949.
18. Taylor, R. and Angius, L., THE BIOCHEMISTRY OF DIABETES. REVIEW ARTICLE, Biochem. J. 250:625-640, 1988.
19. Charlotte, J. Avers, Biología Celular, 2a. ed., Grupo Editorial Iberoamérica, Belmont, Cal., 1983.
20. Méndez, José D., POLIAMINAS EN BIOQUÍMICA E INMUNOLOGÍA, Hicks, G.J.J., Díaz Zagoya, J.C., Bioquímica e Inmunología, Vol II:365-385, 1a. ed., Facultad de Medicina, U.N.A.M., México D.F., 1988.
21. Drury, M.I., DIABETES MELLITUS, 2a. ed., Editorial Médica Panamericana, S.A., Madrid, Esp., 1991.



22. Bowman y Rand, *Farmacología Bases Bioquímicas y Patológicas*, 2a. ed., Nva. Editorial Interamericana S.A. de C.V. México D.F., 1985.

23. Steel, R.G.D., Torrie J. H., *BIOESTADISTICA: Principios y Procedimientos*, 2a. ed., Editorial McGraw-Hill, Bogotá, Col. 1985

24. Méndez, R.I., Guerrero, D.N., Altamirano, L.M., Sosa, C., *EL PROTOCOLO DE INVESTIGACION*, 1a. ed., Editorial Trillas S.A. de C.V., México D.F., 1984.

25. Zárate, A., López Mora, M.A., Valadez, F. y Espinoza, S.L., *BASES PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS*, Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Endocrinas, Hospital General Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, 1986.

26. L. Leyva, C. Ledesma, H. Ramos, Huerta, E. and Méndez, J.D., *HISTOLOGIC FINDINGS IN PAROTIDS OF DIABETIC RATS TREATED WITH POLYAMINES*, Research Division, Faculty of Dentistry, National University of México, 1991.

27. Thams, P., Capito, K. and Hedeskov, C.J., *AN INHIBITORY ROLE FOR POLYAMINES IN PROTEIN KINASE C ACTIVATION AND INSULIN SECRETION IN MOUSE PANCREATIC ISLETS*, *Biochem. J.* 237:131-138, 1986.

28. Corti, A., Astancolle, S. and Davalli, P., *RESPONSE OF HEPATIC ORNITHINE DECARBOXYLASE AND POLYAMINE CONCENTRATION TO SURGICAL STRESS IN THE RAT: Evidence for a permissive effect of catecholamines on glucocorticoid action*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 129/3: 885-891, 1985.

29. Van Den Berg, G.A., Elzinga, H., Nagel, G., Kingma, A.W. and Muskiet, F.A.J., *CATABOLISM OF POLYAMINES IN THE RAT, Polyamines and their non- 7a 1-amino acid metabolites*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 802:175-187, 1984.

30. Balint, G.A. and Varró, V., *Note IN RAT GASTRODUODENAL MUCOSA THE CYTOPROTECTIVE EFFECT OF SULFHYDRYL DRUGS IS NOT MEDIATED VIA ENDOGENOUS PROSTACYCLIN*, *Japan J. Exp. Med.* 58/4:203-205, 1988.

31. Méndez, J.D. y Hicks, J.J., *LAS POLIAMINAS Y EL SISTEMA REPRODUCTOR DE LA HEMBRA I*, *Ginecología y Obstetricia de México*, Vol. 50 (302):157-164, 1982.

32. Méndez, J.D. y Hicks, J.J., METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS EN DIFERENTES CONDICIONES FISIOLÓGICAS DE LA MUJER, *Ginecología y Obstetricia de México*, Vol. 52 (325):133-138, 1984.
33. Ray, T. K., Nandi, J., Pidhorodecky, N. & Meng-Ai, Z., POLYAMINES ARE INHIBITORS OF GASTRIC ACID SECRETION, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol 79:1448-1452, 1982.
34. Tadolini, B., Cabrini, L., Landi, L., Varani, E. & Pasquali P., POLYAMINE BINDING TO PHOSPHOLIPID VESICLES AND INHIBITION OF LIPID PEROXIDATION, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 122 (2):550-555, 1984.
35. Nealon, W.H., Townsend, C.M. & Thompson, J.C., THE TIME COURSE OF BETA CELL DYSFUNCTION IN CHRONIC ETHANOL-INDUCED PANCREATITIS: A PROSPECTIVE ANALYSIS, *Surgery* Vol. 104 (6):1074-1079, 1988.
36. Mohan, Ch. and Bessman, S.P., INSULIN INHIBITION OF GLUCONEOGENESIS BY STIMULATION OF PROTEIN SYNTHESIS, *Biochemical Medicine* 26:403-426, 1981.
37. Robert, A., Lancaster, C., Nezamis, J.E. & Hanchar, A.J., CYTOPROTECTIVE PROSTAGLANDINS, EXOGENOUS OR ENDOGENOUS, CAN MAINTAIN GASTRIC SECRETORY FUNCTION, Department of Experimental Biology, The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan., *Abstracts of Papers* Vol. 74 (5):1086.
38. Rodgers, B.M. and Gamica, A.D., HUMAN SERUM POLYAMINE CHANGES FOLLOWING HEPATECTOMY AND PORTACAVAL SHUNT, Department of Surgery and Pediatrics, University of Florida College of Medicine, *Abstracts of Papers* Vol. 74 (5):1086.
39. Bennett, A. and Curwain, B.P., EFFECTS OF ASPIRIN-LIKE DRUGS ON CANINE GASTRIC MUCOSAL BLOOD FLOW AND ACID SECRETION, *Br. J. Pharmac.* 60:499-504, 1977.
40. Takeuchi, K., Nishiwaki, H., Hara, N. and Okabe, Susumu, EFFECTS OF GASTRIC DISTENSION AND PROSTAGLANDIN ON ACID ETHANOL-INDUCED MUCOSAL LESIONS IN THE RAT I, *Digestive Diseases and Sciences*, Vol. 33(12):1569-1577, 1988.

41. Martin,D., Someren,A.O., and Nasrallah,S.M., THE EFFECT OF PROSTAGLANDIN E 22 1ON ETHIONINE-INDUCED PANCREATITIS IN THE RAT, Gastroenterology 81:736-741, 1981.

42. M 5t 1ller,M.K., Degenhardt,H., KI 5o 1ppel,G., Goebell,H., Bergmann,K., and L 5o 1hr,M., PREVENTION OF TOXIC EFFECTS OF CYCLOSPORIN ON PANCREATIC 7b 1-CELLS OF RATS BY RIOPROSTIL, A NEW PROSTAGLANDIN ANALOGUE, Gut.,29:1524-1530, 1988.

43. Divald,A., Ujhelyi,E., Jeney,A., Lapis,K., and Institoris,L., HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF PROSTACYCLINS ON CCL 24 1-INDUCED LIVER INJURY IN RATS, Exp. and Mol.Path., 42:163-166, 1985.

44. 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, Endoc. Act., 102:561-566, 1983.

45. Reddy,M.K., Heda,G.D. and Reddy,J.K., PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF 7a 1-AMYLASE FROM RAT PANCREATIC ACINAR CARCINOMA, Comparison with pancreatic 7a 1-amylase, Biochem.J., 242: 681-687, 1987.

46. Hannonen,P., Raina,A. and J 5a 1nne J., POLYAMINE SYNTHESIS IN THE REGENERATING RAT LIVER: STIMULATION OF S-ADENOSYLMETHIONINE DECARBOXYLASE, AND SPERMIDINE AND SPERMINE SYNTHASES AFTER PARTIAL HEPATECTOMY, Biocim. Biophys. Acta, 273:84-90, 1972.

47. Konarska,L., Tomaszewski,L., HUMAN SALIVARY ARGINASE AND ITS DEFICIENCY IN ARGININAEMIA, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 23: 337-342, 1985.

48. Morris, D.R.: Section Introduction: Biosynthesis of polyamines. In: Advances in polyamines Research, Vol.1, Campbell, R.A. et. al. Eds., Raven Press New York, 13-15, 1978.

49. Welsh, N., and Sjöholm,A.: POLYAMINES AND INSULIN PRODUCTION IN ISOLATE MOUSE PANCREATIC ISLETS, Biochem. J. 252: 701-707, 1988.

50. Lambert,A.E.:THE REGULATION OF INSULIN SECRETION, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 15:98, 1976.

51. Mendez, J.D., and Arreola, M.A., EFFECT OF L-ARGININE ON PANCREATIC ARGINASE ACTIVITY AND POLYAMINES IN ALLOXAN TREATED RATS, *Biochem. Inter.* 28,4:569-575, 1992.

52. Lacy, E.R., and Ito, S., MICROSCOPIC ANALYSIS OF ETHANOL DAMAGE TO RAT GASTRIC MUCOSA AFTER TREATMENT WITH A PROSTAGLANDIN. *Gastroenterology* 83:619-623, 1982.

53. Guth, P.H., Paulsen, G. and Nagata, H., HISTOLOGIC AND MICROCIRCULATORY CHANGES IN ALCOHOL-INDUCED GASTRIC LESIONS IN THE RAT: Effect of prostaglandin cytoprotection. *Gastroenterology* 87:1083-1090, 1984.

54. Quiroz Gutierrez F., TRATADO DE ANATOMIA HUMANA, Tomo III, Ed. Porrúa, S.A., Quinta Edición.