



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



43
24^o

**"IMPORTANCIA DE LAS POLIAMINAS
EN LOS MECANISMOS DE
BIOSINTESIS PROTEICA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:
MARIA GUADALUPE SANCHEZ BARRIOS

A S E S O R:
Q. F. B. MARIA ESTHER REVUELTA MIRANDA

CUAUTITLAN IZCALLI. EDO. DE MEX.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo " Importancia de las polioleínas en los mecanismos de

biosíntesis proteica "

que presenta la pasante: Sánchez Barríos María Guadalupe,
con número de cuenta: 7541114-7 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlan Ixcalli, Edo. de Méx., a 17 de Agosto 1995.

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ramón Cendejas Ramírez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Martha P. Zúñiga Cruz</u>	
2do. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	

AGRADECIMIENTO.

A la profesora Ma. Esther Revuelta Miranda.

En mi paso por la vida, jamás podrè olvidar que en los momentos mäs difciles, usted siempre tuvo las palabras de aliento adecuadas para no desistir, y estuvo presente siempre para seÑalarme cual era el camino a seguir.

Gracias por todo el tiempo que tuvo a bien dedicar a mi trabajo y que finalmente con su apoyo hoy puedo concluir.

Dios la bendiga por ser simplemente como es, porque todos sabemos que cada profesor deja en nosotros recuerdos buenos o malos, pero algo puedo decirle sin temor a equivocarme, usted deja un recuerdo inborrable en mÌ, y toda la vida la recordarè con gran cariÑo, respeto y admiraciòn.

DEDICADA.

A mi padre: Francisco Sánchez Mendez.

Quien fuè mi ejemplo a seguir, quien infundiò en mi siempre el deseo de ser cada día mejor, de quien solo puedo tener hermosos recuerdos y que hoy, aunque ya no està conmigo, se que se sentiria feliz de saber que he llegado a la meta que el tanto deseaba para mi. Pero pienso que en cualquier lugar donde el se encuentre, sabrà que le dedico este trabajo, porque siempre fuè y seguirá siendo el mejor padre y amigo inmejorable que vivirà eternamente en mi corazòn y estarà conmigo mientras yo viva, GRACIAS.

A mi madre: Herminia Barrios de Sánchez.

Que en todos los momentos de mi vida, tanto los buenos como los malos, me diste cariño y comprensión, que siempre he contado con tu apoyo incondicional y que lo que siempre he recibido de ti es amor, hoy quiero decirte una vez màs que eres la mejor madre que pude haber tenido y que gracias a tus consejos, hoy puedo alcanzar una de las metas màs importantes en mi vida, por todo GRACIAS.

A mi esposo: Genaro Galindo G.

Quien ha sido un padre y esposo ejemplar, y de quien solo he recibido apoyo, cariño y comprensión.

Dios te bendiga hoy y siempre, porque tu eres quien a nuestras vidas has dado un mundo lleno de felicidad, porque siempre tienes las palabras de aliento para seguir luchando y salir adelante de cualquier situación, porque con tus palabras de consuelo sé que todo tendrá solución, porque nos has enseñado lo que es el verdadero y sincero amor. Eres el mejor.

A mi hija Leslie Galindo Sánchez.

Quien es el tesoro máspreciado que la vida me ha dado, y por quien lucharé siempre tratando de ser cada día mejor; porque lo que quiero dejar en tí son los mejores principios con los que a mi me formaron mis padres.

Anhelo que algún día tu seas una mujer exitosa y con el deseo de siempre ser la mejor, eso me hará feliz, porque yo solo quiero para tí lo mejor que la vida pueda darte.

Dios te bendiga siempre y esté a tu lado por siempre, para guiar tus pasos querida hija.

A mis hermanos: Oscar y Benjamín.

Con los que he compartido toda una vida y de quienes siempre tendré los mejores recuerdos y los llevaré en mi corazón en un lugar muy especial.

Al Sr. Genaro Galindo V.

Por ser un gran ser humano y darme cariño y apoyo siempre que lo he necesitado.

A la Sra. Sofía Gutiérrez de G.

Por sus consejos y apoyo en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis cuñados: Fernando, Arturo, Oscar, Sofía, Gustavo y Víctor, con un entrañable cariño.

A mi tío Jesús, a mi abuelita Cande, a Elizabeth y a todas aquellas personas que de algún modo siempre me brindaron su apoyo incondicional, por siempre GRACIAS.

INDICE.

ABREVIATURAS.....	I
1. RESUMEN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. INTRODUCCION.....	4
4. GENERALIDADES.....	6
4.1. CARACTERISTICAS DE LAS POLIAMINAS.....	6
4.2. BIOSINTESIS DE POLIAMINAS.....	8
4.2.1. Aminoácidos.....	8
4.3. PUTRESCINA, ESPERMIDINA Y ESPERMINA.....	11
4.4. ENZIMAS DE LA VIA BIOSINTETICA.....	16
4.4.1. Ornitina descarboxilasa y arginina descarboxilasa en bacterias.....	16
4.4.2. Ornitina descarboxilasa en Sacaromices.....	17
4.4.3. Ornitina descarboxilasa en Phisarum poli- cephalum.....	18
4.4.4. Ornitina descarboxilasa en tejidos de mamíferos.....	20
4.4.5. Biosíntesis de putrescina en plantas.....	22
4.4.6. S-adenosilmetionina descarboxilasa.....	24
4.4.7. Espermidina sintetasa [putrescina aminopro- pil transferasa] y Espermina sintetasa [es- permidina aminopropiltransferasa].....	26

- 4.5. INHIBIDORES DE LA BIOSINTESIS DE PROTEINAS..... 27
 - 4.5.1. Inhibidores de la ornitina descarboxilasa.. 27
 - 4.5.1.1. Difluormetilornitina..... 27
 - 4.5.1.2. Uso del difluormetilornitina en la quimioterapia del càncer..... 29
 - 4.5.1.3. Tratamiento de infecciones parasitarias con difluormetilornitina... 29
 - 4.5.1.4. Efectos del difluormetilornitina en el desarrollo embrionario..... 30
 - 4.5.1.5. Marcado isotòpico específico de ornitina descarboxilasa con difluormetilornitina..... 30
 - 4.5.1.6. Resistencia de medicamentos..... 31
 - 4.5.1.7. Otros inhibidores de la biosíntesis de putrescina..... 31
 - 4.5.2. Inhibidores de S-adenosilmetionina descarboxilasa..... 32
 - 4.5.3. Inhibidores de la espermidina sintetasa y espermina sintetasa..... 34
- 4.6. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PROTEINAS..... 34
 - 4.6.1. Recambio ràpido de ornitina descarboxilasa. 34
 - 4.6.2. Control de la ornitina descarboxilasa por antienzimas..... 38
 - 4.6.3. Control de la ornitina descarboxilasa por modificaciòn post-traduccion..... 40
 - 4.6.3.1 Pèrdida de la actividad despuès del crecimiento en aminos..... 40

4.6.3.2. Baja de la actividad por fosforilación "in vitro".....	41
4.6.3.3. Pérdida de la actividad por transamidación "in vitro".....	42
4.6.4. Amplificación génica.....	42
4.6.5. Regulación de adenosilmetionina descarboxilasa.....	43
4.6.6. Papel de la Arginasa.....	44
4.7. MUTANTES EN LA VIA BIOSINTETICA.....	45
4.7.1. Escherichia coli.....	46
4.7.2. Sacaromices cerevisiae.....	48
4.7.2.1. Mutaciones de la ornitina descarboxilasa.....	48
4.7.2.2. Mutaciones de la adenosilmetionina descarboxilasa.....	48
4.7.2.3. Mutaciones de putrescina, aminopropiltransferasa y espermidina aminopropil transferasa.....	49
4.7.3. Neurospora crassa y Aspegillus nidulans....	50
4.7.4. Otros microorganismos.....	51
4.7.5. Células de mamíferos.....	51
4.7.6. Clonación de genes por la vía biosintética.	52
4.8. FUNCIONES DE LAS POLIAMINAS.....	53
4.8.1. Requerimientos en crecimiento y desarrollo.	53
4.8.2. Interacción de poliaminas con DNA.....	57

4.8.2.1. Estudios "in vivo" sobre la inter- acción de poliaminas y DNA.....	58
4.8.2.2. Estudios "in vitro" sobre la inter- acción de poliaminas y DNA.....	59
4.8.3. Interacción de poliaminas con RNA.....	62
4.8.3.1. Poliaminas y síntesis de RNA.....	62
4.8.3.2. RNA de transferencia.....	64
4.8.4. Poliaminas y biosíntesis de proteínas.....	66
4.8.4.1. Estimulación de la biosíntesis de polipéptidos "in vitro".....	67
4.8.4.2. Efectos de las poliaminas sobre la disociación del ribosoma y estabi- lidad de las subunidades.....	67
4.8.4.3. Efectos de las poliaminas sobre la fidelidad de la traducción y sobre la terminación de la cadena "in vitro".....	68
4.8.4.4. Efectos de las poliaminas sobre la fidelidad de la traducción y sobre la terminación de la cadena "in vivo".....	70
4.8.4.5. Efectos de las poliaminas sobre la iniciación y elongación de la ca- dena de polipéptido "in vivo".....	71
4.8.4.6. Efectos de las poliaminas sobre las aminoacil-tRNA sintetetasas.....	72
4.8.5. Efectos de las poliaminas sobre protein- cinasas.....	72

4.9. METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS.....	74
4.9.1. Conversi3n de espermidina y espermina a putrescina en animales ["ciclo de putresci- na"]; acetiltransferasa de espermidina y oxidasa de poliamina.....	74
4.9.1.1. Acetilaci3n de poliaminas en tejidos animales.....	76
4.9.1.2. Acetilaci3n de poliaminas en bacterias.....	77
4.9.1.3. S3ntesis de N ¹ -acetilespermidina..	78
4.9.1.4. Oxidasa de poliaminas.....	78
4.9.2. Otras oxidasas de amina.....	80
4.9.3. Formaci3n de hipusina.....	81
4.9.4. Otras vias metabolicas.....	82
4.9.4.1. Transglutaminasa.....	82
4.9.4.2. γ -glutamil ciclotransferasa.....	83
4.10. OTROS DERIVADOS Y ANALOGOS DE LAS POLIAMINAS.....	83
4.10.1. Estudios fisicoqu3micos.....	84
5. POLIAMINAS Y CANCER.....	84
6. CONCLUSIONES.....	85
7. BIBLIOGRAFIA.....	86

ABREVIATURAS.

α	ALFA.
β	BETA.
γ	GAMA.
δ, Δ	DELTA.
ϕ	Fi.
D.	DALTON.
Kd.	KILODALTON.
ATP.	5'-TRIFOSFATO DE ADENOSINA.
GTP	TRIFOSFATO DE GUANOSINA.
FAD	FLAVIN-ADENIN-DINUCLEOTIDO.
ADP	5'-DIFOSFATO DE ADENOSINA.
NAD	NICOTINAMIDA-ADENIN-NUCLEOTIDO.
ppGpp	5'DIFOSFATO 3'-DIFOSFATO DE GUANOSINA.
MGBG	METIL GLIOXAL BIS GUANIL HIDRAZONA.
AMpC	3'5'-FOSFATO CICLICO DE ADENOSINA.
Km.	CONSTANTE DE MICHAELIS.
DNA	ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO.
RNA	ACIDO RIBONUCLEICO.
mRNA	ACIDO RIBONUCLEICO MENSAJERO.
tRNA	ACIDO RIBONUCLEICO DE TRANSFERENCIA.
HEM	GRUPO PROSTETICO QUE JUNTO CON LA PROTEINA GLOBINA, FORMA PARTE DE LA HEMOGLOBINA, PIGMENTO PRESENTE EN LOS GLOBULOS ROJOS.

1.- RESUMEN.

Interesante ha sido el desarrollo en los últimos años sobre el crecimiento de las poliaminas naturales; Putrescina, Espermina y Espermidina. Su función específica permanece oscura, pero su distribución ubicua, su alta concentración en células y el aumento en sus concentraciones en tejidos con crecimiento rápido, ha estimulado la investigación de estos compuestos.

Las vías biosintéticas para la Putrescina, Espermina y Espermidina están bien establecidas. Estas vías fueron primero estudiadas en procariotes, pero en general los pasos biosintéticos se han encontrado en eucariotes.

Las enzimas que intervienen en los pasos específicos han sido purificadas y caracterizadas. Dos de estas enzimas revisten particular interés; Ornitina descarboxilasa y Adenosil metionina descarboxilasa.

Gran interés ha despertado el encontrar mutantes que tienen defectos en los pasos biosintéticos de poliaminas en *Escherichia Coli*, *Saccharomyces Cerevisiae*, *Neurospora Crassa* y células de linfoma de ratón; los estudios con estos mutantes han demostrado que las poliaminas se requieren para el crecimiento.

Una característica fundamental de las poliaminas es su carácter polibásico, lo cual les brinda mayor afinidad por constituyentes acídicos que los que exhiben el yodo, sodio, potasio, o las monoaminas, èste carácter polibásico es màs relevante en la Espermina por sus cuatro grupos positivos. Es muy probable que la naturaleza polibàsica de las poliaminas sea importante en determinar su acción fisiològica.

Actualmente existe informaciòn acerca de los efectos de las poliaminas "in vitro" e "in vivo" en muchos sistemas, incluyendo la biosíntesis del DNA, RNA y proteínas. Los datos claramente indican la naturaleza esencial de las poliaminas en los mecanismos biosintéticos de las proteínas.

2.- OBJETIVOS.

I.- Revisar la literatura en relación a la biosíntesis y catabolismo de las poliaminas y su distribución en la naturaleza.

II.-Examinar la influencia que las poliaminas pueden tener en los mecanismos de autoduplicación, transcripción, procesamiento del RNA y en la traducción del mensaje genético en relación con los mecanismos de crecimiento y desarrollo.

3.- INTRODUCCION.

En los últimos años la Biología Molecular ha ido evolucionando hacia el desarrollo de lo que es la base química de la transmisión hereditaria, de estructuraciones características y de la diferenciación celular, en lo cual radica la mayor importancia de las investigaciones para el esclarecimiento de la estructura, biosíntesis y de las funciones de los ácidos nucleicos y proteínas.

Los ácidos nucleicos y las proteínas pertenecen al grupo de sustancias naturales macromoleculares, y estas sustancias son de un significado extraordinario para las propiedades estructurales todas de los seres vivos.

Ahora bien, si hablamos de síntesis de proteínas, resulta sumamente importante señalar el papel que desempeñan ciertas moléculas o compuestos llamadas poliaminas. La función biológica y bioquímica de las poliaminas naturales Putrescina, Espermidina y Espermina ha sido especialmente estudiada en relación a los organismos animales. Estos compuestos son universalmente distribuidos en toda la materia viva.

La biosíntesis a partir de la ornitina y metionina es controlada y tal vez fluctúa de acuerdo con las necesidades

metabòlicas de las cèlulas. Las poliaminas interactúan fuerte y especialmente con àcidos nuclèicos "in vitro". Tal parece que en condiciones fisiològicas una porción sustancial de poliaminas en cèlulas es no covalente en comparaciòn a los àcidos nuclèicos y a estructuras que contengan àcidos nuclèicos, como los ribosomas.

Las poliaminas son capaces de estimular síntesis de proteínas y de àcidos ribonuclèicos "in vitro". Existen sistemas caracterizados por ràpido crecimiento de poliaminas y RNA acumulados en paralelo. Las evidencias que existen acerca de que las poliaminas puedan tener un papel esencial en síntesis de proteínas y/o síntesis de àcidos nuclèicos son fundamentadas en las observaciones de bacterias mutantes por deficiencia en poliaminas, a pesar de que algunas funciones específicas no han sido establecidas con certeza.

Algunas aplicaciones clínicas de poliaminas relativas a la investigaciòn del càncer seràn discutidas brevemente.

4.- GENERALIDADES.

Durante los últimos veinte años, el interés por las poliaminas naturales Putrescina, Espermidina y Espermina se ha incrementado debido a la participación que éstas tienen en los procesos de duplicación, transcripción y traducción genética.

La función específica de las poliaminas no es clara, pero su distribución ubicua, su alta concentración presente en células de intestino grueso, en células cancerosas y otras, ha estimulado la investigación sobre éstos compuestos.

4.1 CARACTERISTICAS DE LAS POLIAMINAS.

Las poliaminas son consideradas como estructuras de carácter orgánico, constituidas por cadenas hidrocarbonadas variables y cuya característica particular es la de poseer más de un grupo amino.

Estas estructuras se encuentran en todas las bacterias y en la mayoría de las células animales. Son factores de crecimiento para algunos microorganismos y sirven para estabilizar las estructuras de las membranas de las

bacterias, así como las estructuras de los ribosomas de algunos virus y del DNA de muchos organismos.

En los mamíferos, la Putrescina se produce por descarboxilación de la ornitina, bajo la acción de la ornitina descarboxilasa. Y en la Escherichia Coli, la Putrescina se forma a partir de la Arginina.

En recientes publicaciones aparecen también poliaminas como Poli-ASP; Poli-GLU; Poli-LIS; Poli-ARG; aunque no todas ellas desempeñan papel fisiológico importante [al menos publicado]; indicando que la Espermidina, Espermina y la Putrescina son las más estudiadas.

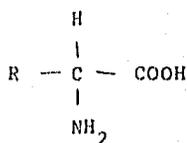
Las características más importantes de las poliaminas durante la década de los ochentas, han sido sus propiedades polibásicas, las cuales brindan una mayor afinidad por moléculas ácidas que el mostrado por cationes inorgánicos como el Na^{1+} , K^{1+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , o monoaminas; esta característica polibásica es mayor en la Espermina, debido a sus 4 grupos positivos.

4.2. BIOSINTESIS DE POLIAMINAS.

4.2.1. Aminoácidos.

Son moléculas que constituyen el alfabeto de la estructura proteica y determinan muchas de las propiedades importantes de las proteínas.

La formula estructural de los α -aminoácidos hallados en las proteínas es la siguiente:



Para llegar a la obtención de las poliaminas es necesario señalar que se debe partir de 3 aminoácidos que son los siguientes:

- a) L-ornitina.
- b) L-arginina.
- c) L-metionina.

Estos aminoácidos presentan en común la característica de poseer un grupo carboxilo libre y un grupo amino libre, no sustituido en el átomo de carbono alfa. Cada aminoácido posee un grupo R característico, éstos grupos son "las

letras del alfabeto molecular de la estructura protéica".

El método más significativo se funda en la polaridad de los grupos R. Existen cuatro clases principales de aminoácidos que son:

- 1) Grupos R no polares ò hidrófobos.
- 2) Grupos R polares sin carga.
- 3) Grupos R con carga positiva.
- 4) Grupos R cargados negativamente.

Dentro de cada clase existen considerables variaciones en el tamaño, la forma y la polaridad de los grupos R.

Además de los 20 aminoácidos comunes y de otros poco frecuentes de las proteínas, se conocen unos 150 aminoácidos más que se encuentran en diferentes células y tejidos en forma libre o combinada, pero nunca en las proteínas. La mayor parte de ellos son derivados de los α -aminoácidos hallados en las proteínas, pero también se conocen β , γ , y δ -aminoácidos.

Algunos aminoácidos no protéicos actúan como precursores importantes o intermediarios en el metabolismo, así la β -alanina es el precursor de la vitamina ácido pantoténico. La citrulina y la ornitina son intermediarios en la síntesis de la arginina, etc.

Otros aminoácidos no protéicos actúan como agentes químicos para la transmisión de los impulsos nerviosos, como sucede con el ácido γ -amino butírico.

El conocimiento de las propiedades ácido-básicas de los aminoácidos es extremadamente importante en la comprensión y el análisis de las propiedades de las proteínas.

Los aminoácidos cristalizados poseen puntos de fusión o de descomposición relativamente altos; generalmente por encima de los 200 °C. Son más solubles en agua, que en disolventes menos polares.

La conducta ácido-básica de los aminoácidos corrientes puede formularse con la máxima sencillez utilizando los términos de la Teoría de ácidos y bases de Brønsted-Lowry.

Por ejemplo, el grupo guanidino de la arginasa es fuertemente básico, solamente pierden sus protones a valores de pH muy elevados. A pH = 7 posee carga positiva neta.

Con excepción de la glicocola, todos los aminoácidos obtenidos a partir de la hidrólisis de las proteínas, en condiciones lo suficientemente suaves muestran actividad óptica, es decir, pueden hacer girar el plano de la luz polararizada cuando se examinan en un polarímetro.

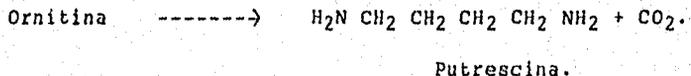
La actividad óptica se encuentra en todos los compuestos capaces de existir en dos formas cuyas estructuras son como imágenes especulares, no superponibles. Esta condición la cumplen muchos compuestos que poseen un átomo de carbono asimétrico, es decir, uno que posea 4 sustituyentes distintos.

A causa de la naturaleza tetrahédrica de los orbitales Sp^3 del átomo de carbono, los 4 grupos sustituyentes distintos pueden ocupar 2 ordenaciones diferentes en el espacio en torno al átomo de carbono. Y en base a los valores de sus rotaciones específicas que algunos aminoácidos aislados a partir de las proteínas son dextrorrotatorios (+), y otros son levorrotatorios (-), cuando se observan a $pH = 7$.

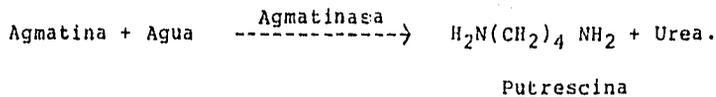
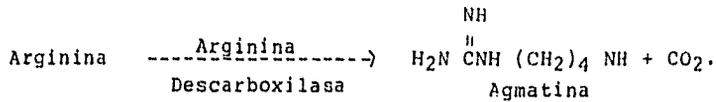
4.3. PUTRESCINA, ESPERMIDINA Y ESPERMINA.

Las vías biosintéticas para la Putrescina, Espermidina y Espermina han sido establecidas como se puede observar a continuación;

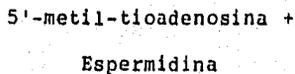
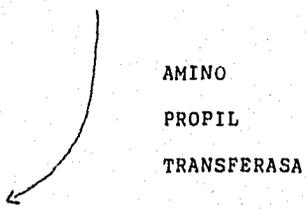
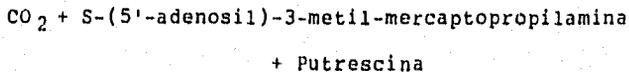
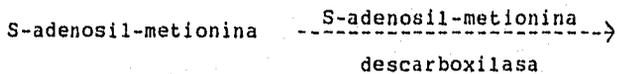
En mamíferos la putrescina se produce por descarboxilación de la ornitina, bajo la acción de la ornitina descarboxilasa.



En Escherichia Coli, la Putrescina se forma a partir de la arginina.



La S-adenosil-metionina se descarboxila primero para reaccionar después con la Putrescina formando Espermidina.



Y la Espermidina se convierte en Espermina por repetición de estas dos últimas reacciones.

Estas vías fueron primero estudiadas en procariotes. Pero en general, los mismos pasos biosintéticos se encontraron en eucariotes. Las enzimas comprometidas en estos pasos específicos fueron purificadas y caracterizadas de distintas fuentes. Dos de estas enzimas tienen un interés particular, la ornitina descarboxilasa y la adenosilmetionina descarboxilasa.

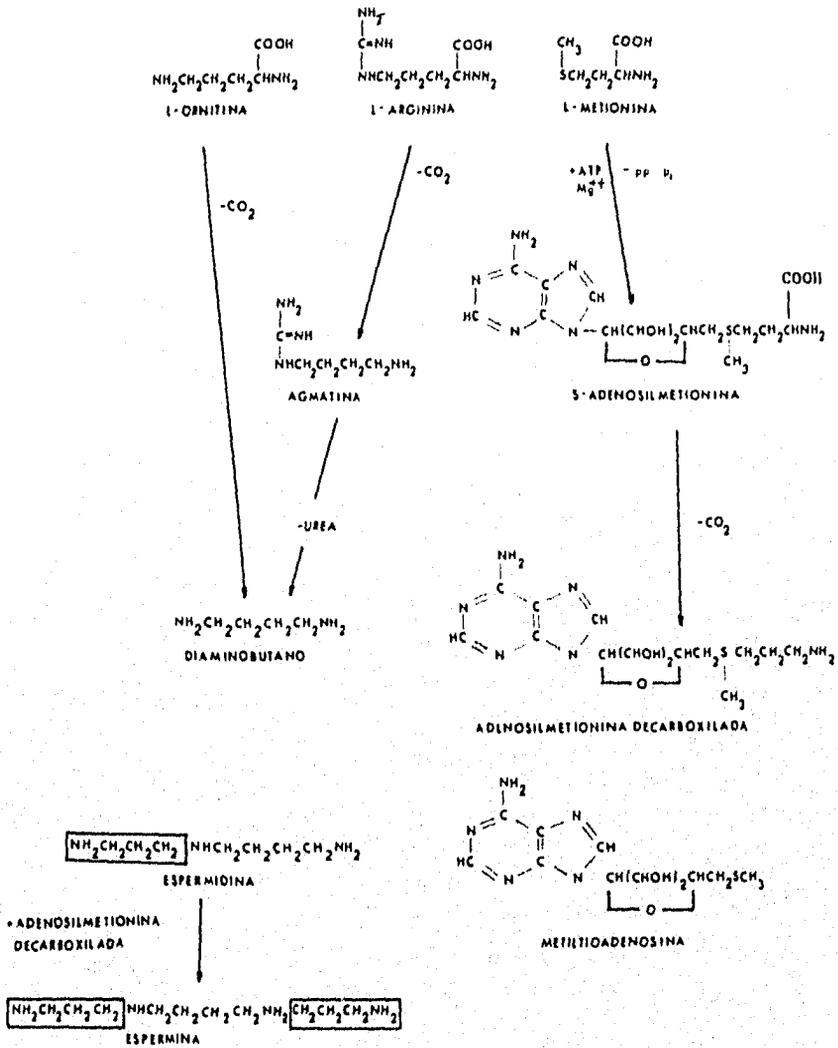
La ornitina descarboxilasa tiene una vida media en células de mamíferos de aproximadamente diez minutos, aumenta rápida y dramáticamente a una gran variedad de estímulos de crecimiento.

La adenosilmetionina descarboxilasa también tiene una vida media corta de aproximadamente una a dos horas, posee el interés adicional de que contiene piruvato unido covalentemente como cofactor en lugar de fosfato de piridoxal, usual para descarboxilasas.

La vida media corta de estas dos enzimas refleja la importancia fisiológica de las poliaminas, e indica la necesidad de las células para una respuesta rápida en sus niveles de poliaminas a una variedad de estímulos. La integración de estas vías biosintéticas se muestra en la Fig. [1].

Fig. 1

VIAS BIOSINTETICAS.



El más importante y reciente descubrimiento en el área de las poliaminas, es la preparación de un número de mutantes de *Escherichia Coli*, *Saccharomices Cerevisiae*, *Neurospora Crassa* y células de linfoma de ratón [59], que representan defectos en la vía biosintética de las poliaminas así como en la biodisponibilidad de un mecanismo específico o irreversible, basado en la inhibición de la ornitina descarboxilasa [difluormetil ornitina]. Tanto los mutantes como las células tratadas con difluormetil ornitina se usan para el estudio de los efectos de la depleción de las poliaminas "in vivo" [88]

Finalmente se han realizado experimentos con varios tipos de células [59 y 88], que han demostrado que las poliaminas son necesarias para el crecimiento, sin embargo, ¿cual es el papel fisiológico de las poliaminas y el mecanismo de acción?; Son dos incógnitas que constituyen un reto para la investigación.

Parece muy factible que la naturaleza polibásica de las poliaminas sea muy importante para determinar su acción fisiológica en cualquier experimento, especialmente "in vitro".

Es muy difícil conocer si los efectos observados son de importancia fisiológica o son artefactos que resultan de interacciones no específicas de poliaminas-poliácidos.

Se han discutido los efectos de las poliaminas "in vivo" e "in vitro" sobre el DNA, RNA y biosíntesis de proteínas. Sin embargo, se puede anticipar que la disponibilidad de una variedad de mutantes en diferentes tipos de células y de inhibidores que depletan a las células de poliaminas conduzca a una marcada aceleración en el conocimiento de las funciones de éstos compuestos. [73]

4.4. ENZIMAS DE LA VIA BIOSINTETICA.

4.4.1. Ornitina descarboxilasa y Arginina descarboxilasa en bacterias.

La Escherichia Coli tiene dos vias que conducen a la formación de la Putrescina:

- a) Ornitina descarboxilasa, y
- b) Arginina descarboxilasa-agmatina ureohidrolasa.

Se han descrito dos diferentes proteínas que realizan la descarboxilación; una es una proteína constitutiva biosintética, presente en todas las cepas; la segunda es una enzima inducible degradativa presente solo en ciertas cepas y expresada bajo condiciones muy especiales de crecimiento [es decir, por ejemplo en un medio con alto contenido en ornitina o arginina y un pH ácido]. Todas han sido

purificadas hasta la homogeneidad. Y son dependientes de fosfato de piridoxal. La arginina descarboxilasa requiere de Mg^{2+} para una actividad òptima.

La ornitina descarboxilasa ha sido tambièn purificada hasta homogeneidad de *Lactobacillus casei*. La agmatina ureo-hidrolasa ha sido purificada de *Escherichia Coli*. La lisina descarboxilasa, produce cadaverina [1'5-diamino pentano]. Y ha sido purificada a homogeneidad de *Escherichia Coli* creciendo bajo condiciones inducidas; existe evidencia preliminar para una lisina descarboxilasa inducible y una no inducible. La formaciòn de cadaverina se ha visto que aumenta en cepas mutantes que carecen de ornitina descarboxilasa.

4.4.2. Ornitina descarboxilasa en Sacaromices.

La ornitina descarboxilasa ha sido purificada de *Sacaromices cerevisiae* y de *Sacaromices uvarum*, y se viò que consta de una subunidad con peso de 68,000 D. y de 73,000 D. respectivamente, la enzima de *Sacaromices cerevisiae* fuè purificada de un mutante spe 2, el cual es desreprimido por ornitina descarboxilasa. Sin embargo hay desacuerdo sobre si estas preparaciones son homogèneas o solo tienen un 10% de pureza. [67]

purificadas hasta la homogeneidad. Y son dependientes de fosfato de piridoxal. La arginina descarboxilasa requiere de Mg^{2+} para una actividad óptima.

La ornitina descarboxilasa ha sido también purificada hasta homogeneidad de *Lactobacillus casei*. La agmatina ureo-hidrolasa ha sido purificada de *Escherichia Coli*. La lisina descarboxilasa, produce cadaverina [1'5-diamino pentano]. Y ha sido purificada a homogeneidad de *Escherichia Coli* creciendo bajo condiciones inducidas; existe evidencia preliminar para una lisina descarboxilasa inducible y una no inducible. La formación de cadaverina se ha visto que aumenta en cepas mutantes que carecen de ornitina descarboxilasa.

4.4.2. Ornitina descarboxilasa en Sacaromices.

La ornitina descarboxilasa ha sido purificada de *Sacaromices cerevisiae* y de *Sacaromices uvarum*, y se vió que consta de una subunidad con peso de 68,000 D. y de 73,000 D. respectivamente, la enzima de *Sacaromices cerevisiae* fué purificada de un mutante spe 2, el cual es desreprimido por ornitina descarboxilasa. Sin embargo hay desacuerdo sobre si estas preparaciones son homogéneas o solo tienen un 10% de pureza. [67]

Parece probable que la enzima purificada la represente un producto de degradación; debido a que la inmunoprecipitación solo mostró una forma con un peso molecular de 86,000 D. en extractos frescos de *Sacromices cerevisiae* preparados en presencia de un inhibidor proteolítico; la forma de 86 Kd [Kilodalton] no ha sido aún purificada hasta homogeneidad. La actividad específica de las formas aisladas de 68 y 73 Kd es más baja que la actividad de ornitina descarboxilasa aislada de otras fuentes, y tal vez esta actividad específica más baja, esté relacionada a la degradación proteolítica durante el aislamiento. [67]

4.4.3. Ornitina descarboxilasa en *Phisarum policephalum*.

Se ha estudiado la ornitina descarboxilasa en fragmentos de limo de *Phisarum policephalum*, debido a que el *Phisarum policephalum* tiene altas concentraciones de la enzima en comparación a los tejidos animales [0.01 % de la proteína soluble]. Las células son fácilmente cultivadas y mucho más fáciles de manejar que las células de mamíferos o de tejidos. La enzima ha sido purificada por tres laboratorios; pero las características de estas tres preparaciones purificadas son muy diferentes, hasta ahora no hay explicación sobre estas diferencias. [70]

Se encontraron dos formas; A y B de ornitina descarboxilasa con afinidades diferentes por el fosfato de piridoxal [Km 0.05 y 12.8] debido a el alto Km de la forma B se explica que sea esencialmente inactiva a concentraciones fisiológicas de fosfato de piridoxal. Ambas formas presentan igual peso molecular, pero diferente punto isoeléctrico. La forma A puede ser convertida a la forma B por una enzima modificadora dependiente de espermidina o espermina, la cual ha sido parcialmente purificada de micoplasmodia. Las diferencias químicas entre la forma A y B no se conocen, pero no se requiere de ATP para esta conversión. La subunidad de ambas formas es de 52,000 D. [69].

Recientemente, otro grupo no encontró las dos formas de ornitina descarboxilasa, pero detectó una subunidad diferente con peso molecular de 43,000 D. para la enzima purificada [70].

Un tercer grupo ha purificado ornitina descarboxilasa de nucleolo de *Phisarum policephallum*; el cual tiene una subunidad con peso molecular de 70,000 D. La enzima nucleolar representa un pequeño porcentaje de la ornitina descarboxilasa total en la célula y tiene una actividad mucho más baja. Sin embargo, esta enzima tiene un interés exitante, debido a que durante la mayor parte de los pasos de la purificación, la enzima del nucleolo está íntimamente asociada con una proteína cinasa, que es poliamina

dependiente y puede fosforilar e inactiva a la ornitina descarboxilasa [70].

4.4.4. Ornitina descarboxilasa en tejidos de mamíferos.

La ornitina descarboxilasa en tejidos de mamíferos ha interesado a muchos laboratorios, debido a su tasa de recambio extraordinariamente alta, y a su respuesta rápida a estímulos hormonales y de otra índole. La ornitina descarboxilasa ha sido purificada hasta homogeneidad de algunas fuentes de mamíferos, después de que la enzima ha sido inducida por estímulos tales como andrógenos o por tioacetamida. Aunque estos estímulos aumentan la cantidad de enzima tisular muchas veces, la ornitina descarboxilasa representa solo una fracción muy pequeña de la proteína tisular total, y se requiere de una exhaustiva purificación. Por ejemplo; después del tratamiento con tioacetamida, la ornitina descarboxilasa representa solamente el 0.0003 % de la proteína en el hígado de la rata y se requiere aumentar unas 350,000 veces la purificación para obtener una preparación homogénea. La enzima es particularmente activa en riñón de ratón, después de la estimulación por andrógenos pero solo representa el 0.01 % de la proteína celular. Recientemente, un mutante de células de linfoma de ratón con una alta cantidad de ornitina descarboxilasa [15 % de la proteína celular], ha sido seleccionada después del

tratamiento con difluormetilornitina, pero hasta ahora esta enzima no ha sido purificada[21].

Se han producido anticuerpos policlonales y monoclonales contra ornitina descarboxilasa en mamíferos. Estos anticuerpos se han usado:

- a) Para medir el recambio en la producción de la proteína ornitina descarboxilasa "in vivo".
- b) Para determinar la localización celular de la enzima por inmunofluorescencia.
- c) Para obtener mRNA para ornitina descarboxilasa en experimentos de clonación.[47]

A pesar de que la ornitina descarboxilasa ha sido descrita en el núcleo de las células de mamíferos, la mayor parte de la enzima se encuentra en el citoplasma. Esta conclusión se basa en estudios de inmunofluorescencia, así como de autoradiografía después del tratamiento de las células con difluormetilornitina radiactivo; un inhibidor específico irreversible de la enzima. Sin embargo, estos estudios fueron hechos después de que la enzima fue inducida; recientemente se ha descrito que cuando no hay inducción de las células, la ornitina descarboxilasa se encuentra por igual en el núcleo y en el citoplasma.[10]

4.4.5. Biosíntesis de la putrescina en plantas.

Los primeros trabajos parecían indicar que en plantas la putrescina era derivada de arginina y que la ornitina descarboxilasa no estaba presente en cantidades significativas. Sin embargo, recientemente la ornitina descarboxilasa ha sido encontrada en plantas con crecimiento rápido y ha sido purificada de las semillas de cebada en germinación tanto de citoplasma como del núcleo en donde se encuentra fuertemente ligada a la cromatina. A la luz de estos estudios, está en duda si la putrescina presente se deriva primeramente de la ornitina o de la arginina [8].

La biosíntesis de la putrescina ha sido estudiada detalladamente en *Lathirus sativus* y es muy diferente de la vía descrita en animales, levaduras y bacterias [76].

Involucra los siguientes pasos:

1.-

Arginina descarboxilasa: Arginina \rightarrow Agmatina + CO_2 .

2.-

Agmatina iminohidrolasa: Agmatina + H_2O
 \rightarrow N-carbamoil putrescina
+ NH_3

3.-

Putrescina carbamoil transferasa: N-carbamoil putrescina
+ Pi \rightleftharpoons putrescina + carbamoil Fosfato

4.-

Ornitina carbamoil transferasa: Carbamoilfosfato
+ ornitina \rightleftharpoons citrulina
+ Pi

El primer paso se lleva a cabo por la arginina descarboxilasa, una enzima que està ampliamente distribuida en plantas y ha sido purificada homogeneamente de *Lathirus sativus*. Los pasos dos, tres y cuatro [ciclo de agmatina] se verifican por una enzima multifuncional que ha sido purificada a homogeneidad. El papel intermediario de la carbamoil putrescina en la formaciòn de putrescina en plantas ya habia sido descrito, pensandose que la putrescina se formaba por hidròlisis. Una carbamoil transferasa de putrescina similar, ha sido purificada de *Streptococcus faecalis*[43].

4.4.6. S-adenosilmetionina descarboxilasa.

El aminopropil de espermina y espermidina es derivado de adenosilmetionina descarboxilasa, el cual se formò por la acción de la adenosilmetionina descarboxilasa. Esta enzima ha sido altamente purificada de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, riñón de ratón, hígado de rata y de carnero, músculo de rata, linfocitos de bovino y glándulas mamarias de ratón[20].

Las enzimas de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y de hígado tienen piruvato unido covalentemente, el cual se requiere para su actividad, el fosfato de piridoxal no está comprometido, se encuentra una molécula de piruvoil por subunidad de enzima[20].

La enzima de *Escherichia coli*, tiene un peso molecular de ciento ocho mil D. [108,000 D.] con seis [6] subunidades. La enzima de la levadura tiene un peso molecular de 88,000 D. con dos subunidades. Para las enzimas de hígado se han descrito dos valores: uno de 68,000 D. con cuatro, y otro de 155,000 D. también con cuatro subunidades[1].

La presencia del piruvoil unido covalentemente se requiere para la actividad de la enzima; y se describió primero para histidina descarboxilasa de *Lathyrus sativus* y para reductasa prolina de *Clostridium stricklandii*. Se ha

encontrado también en otras dos enzimas bacterianas [fosfatidil serina descarboxilasa y aspartico descarboxilasa] pero en ninguna de las enzimas de eucariotes excepto para adenosilmetionina descarboxilasa[4].

Los mecanismos de la formación de piruvoil en adenosilmetionina descarboxilasa se desconocen. No se ha descrito aún una proenzima de adenosilmetionina descarboxilasa, aunque por la analogía con el trabajo de Snell y sus colaboradores sobre el contenido de descarboxilasa de histidina que contiene piruvoil de *Lactobacillus casei*, tal proenzima es de esperarse. En su trabajo el precursor fue separado por serinólisis de la unión serina-serina para producir una enzima activa con un grupo piruvoil final[5].

El contenido de piruvato de la adenosilmetionina descarboxilasa es inhibido por NaBH_4 y NaCNBH_3 , este último inhibe solo en presencia de sustrato. Después de la reducción del NaCNBH_3 ; la enzima contiene productos enlazados covalentemente, indicando que una base de Schiff se ha formado durante la reacción. La falta de reducción por NaCNBH_3 en ausencia de un sustrato, indica que el grupo piruvoil no es una base tipo Schiff unida a lisina, al contrario de las enzimas que contienen fosfato de piridoxal. Estos resultados están de acuerdo con el efecto de NaBH_4 y NaCNBH_3 sobre histiadina descarboxilasa de *Lactobacillus casei* descrito por Snell [5].

Aunque tanto las enzimas de procariotes y eucariotes son semejantes o similares en contener piruvato enlazado covalentemente, difieren en el metal requerido. Las enzimas de la *Escherichia coli* requieren un catión divalente tal como el Mg^{2+} y no son estimulados por putrescina. Se requiere un solo sitio de unión para el metal por subunidad de la enzima. En cambio, las enzimas de eucariotes son evidentemente estimuladas por la putrescina y no requieren de Mg^{2+} [1].

En común con las descarboxilasas dependientes de fosfato de piridoxal la reacción de adenosilmetionina descarboxilasa procede con retención de la configuración estérica del sustrato [68].

4.4.7. Espermidina Sintetasa [putrescina aminopropiltransferasa] y Espermina Sintetasa [espermidina aminopropiltransferasa].

La espermidina sintetasa fuè primero purificada de *Escherichia coli* y mostrò seguir la síntesis de espermidina y metiltioadenosina a partir de putrescina y adenosilmetionina descarboxilada. La *Escherichia coli* no contiene espermina, ni tampoco està presente la espermina sintetasa. Sin embargo, la espermidina sintetasa puede seguir la síntesis de espermina a partir de espermidina y de

3 aminopropil-1'5-diaminocadaverina de la cadaverina "in vitro"[30].

A pesar de que la espermidina sintetasa y la espermina sintetasa no han sido purificadas de levaduras, las evidencias genéticas indican que las dos enzimas están comprometidas en la síntesis de espermidina y espermina. Ambas enzimas han sido separadas y purificadas a homogeneidad de fuentes de mamíferos. Se ha descrito una purificación parcial de espermidina sintetasa en plantas[74].

4.5. INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE PROTEINAS.

4.5.1. Inhibidores de la ornitina descarboxilasa.

4.5.1.1. Difluormetilornitina.

Un desarrollo importante en la investigación de poliaminas ha sido la síntesis y la disponibilidad del difluormetilornitina, un potente inhibidor de la ornitina descarboxilasa, mediante un mecanismo conocido como "suicida". El difluormetilornitina actúa específicamente sobre ornitina descarboxilasa y esencialmente no tiene acción sobre ninguna otra enzima. Consecuentemente se ha usado para inhibir la biosíntesis de putrescina en diversas células "in vitro" e "in vivo", para estudios de los efectos

de la deprivación de poliaminas sobre el crecimiento y función de varias células cuando no se dispone de mutantes deficientes de poliaminas. Después de la administración de difluormetilornitina, los niveles de putrescina y espermidina, pero no usualmente para la espermina, bajan rápidamente, especialmente en células de división rápida hay una dramática inhibición en el crecimiento y la división. Estos efectos son evitables o reversibles con la adición de putrescina[24].

Debido a que el difluormetilornitina inhibe fuertemente la división celular, ha habido un interés considerable en el uso terapéutico potencial de este compuesto. Estudios en animales mostraron efectividad sobre la inhibición del crecimiento de tumores, sobre interrupción del embarazo y en el tratamiento de infecciones por protozoarios. La toxicidad "in vivo" del difluormetilornitina es muy baja, sin embargo, se ha descrito trombocitopenias, leucopenia y anemia reversible[19].

4.5.1.2. Uso del difluormetilornitina en la quimioterapia del càncer.

En estudios clínicos, pacientes con varios tipos de tumores han sido tratados con difluormetilornitina más metilglioxal bis [guanil hidrazona] un potente inhibidor de la adenosilmetionina descarboxilasa, o con estos compuestos en asociación con otros agentes quimioteràpicas. A pesar de lo prometedor de los estudios en células, en animales y en cultivos celulares, el estado presente en estos tratamientos para tumores humanos es, en general, decepcionante. Aunque frecuentemente hay notable inhibición inicial del crecimiento del tumor, generalmente no hay mejoramiento en la esperanza de vida. Estos resultados desafortunados pueden reflejar el tiempo crítico del tratamiento en experimentos clínicos contra estudios en animales. En experimentos con animales los agentes terapèuticos se administran usualmente poco después de la inoculación del tumor, mientras el tratamiento en humanos se dà tardiamente en el curso de la enfermedad[19].

4.5.1.3. Tratamiento de infecciones parasitarias con difluormetilornitina.

El difluormetilornitina es efectivo en el tratamiento de coccidiosis [Eimeria tenella] en pollos. En malaria de roedores [Plasmodium berghei], no hay efecto sobre las

formas eritrocíticas pero hay una considerable protección contra la infección por esporozoítos. El difluormetilornitina es muy efectivo en el tratamiento de infecciones agudas de tripanosomiasis de roedores del Africa, y promete tener aplicaciones clínicas en el ser humano[40].

4.5.1.4. Efectos del difluormetilornitina en el desarrollo embrionario.

El difluormetilornitina es muy efectivo como abortivo si se administra en el agua para beber del quinto a el octavo día de gestación en ratones, o inyectado intraperitonealmente del cuarto al séptimo día de embarazo en ratas. El difluormetilornitina ha mostrado bloquear también el desarrollo embrionario de pollos en gastrulación, pero no tiene efectos contra gestaciones en conejos. No se han descrito estudios clínicos en humanos[72].

4.5.1.5. Marcado isotópico específico de ornitina descarboxilasa con difluormetilornitina.

El marcado con difluormetilornitina ha mostrado ser particularmente útil en estudios enzimáticos debido a que se une covalentemente en forma específica a la ornitina descarboxilasa. Se ha usado para marcar a la ornitina

descarboxilasa aún en extractos crudos, para cuantificar la cantidad de ornitina descarboxilasa presente, es decir, el número de moles presentes activos. Sin embargo, es necesario que la enzima esté activa, ya que el inhibidor es dependiente de este mecanismo. La enzima marcada puede usarse como ayuda en la purificación o actuar como un reactivo para radioinmunoanálisis[50].

La ornitina descarboxilasa se ha marcado "in vivo" y para su localización celular en el túbulo renal.

4.5.1.6. Resistencia a medicamentos.

El difluormetilornitina y el inhibidor reversible, la β -metilornitina, han sido usados efectivamente para seleccionar células mutantes de mamíferos resistentes a medicamentos que sobreproducen ornitina descarboxilasa[61].

4.5.1.7. Otros inhibidores de la biosíntesis de putrescina.

Se han sintetizado otros inhibidores de ornitina descarboxilasa incluyendo el monofluormetilornitina, monofluorputrescina y una variedad de derivados acetilénicos y vinílicos de ornitina y putrescina, el más activo es el β -metilacetilénico putrescina, el α -metilornitina y el α -

hidrazinoornitina los cuales se han usado en estudios anteriores como inhibidores, pero con menos efectividad. [11]

Aunque el difluormetilornitina inhibe la ornitina descarboxilasa de una extensa variedad de células, no inhibe la enzima derivada de *Escherichia coli*, ni la ornitina descarboxilasa de otras bacterias como *Pseudomonas*. Por el contrario el monofluormetilornitina y el monofluormetilputrescina son efectivos contra la enzima de *Escherichia coli* así como de otras fuentes.

El difluormetilarginina ha sido sintetizado y es efectivo para inhibir la arginina descarboxilasa de bacterias.

4.5.2. Inhibidores de S-adenosilmetionina descarboxilasa.

El metilglioxal bis[guanilhidrazona] [MGBG] continuó siendo muy usado para la inhibición de la adenosilmetionina descarboxilasa y consecuentemente de la biosíntesis de la espermidina, tanto "in vivo" como "in vitro". Sin embargo, existen algunas limitaciones en su utilidad, debido a que:

- a) Es un inhibidor reversible.
- b) No es absolutamente específico y además inhibe algunas otras enzimas como la diamino oxidasa, y

c) Tiene toxicidad importante.

Una serie de análogos han sido también sintetizados y estudiados, uno de los cuales es un inhibidor irreversible [(1,1'[metiletanediylidina)dinitrilo]-bis(3-aminoguanidina)]. El último compuesto, sin embargo, no mostró una potencia inhibidora mayor "in vivo" que el MGBG y a menudo la inhibición es irreversible[23].

El MGBG se ha usado para la terapia de neoplasias, pero su uso clínico es limitado debido a su toxicidad. Recientemente el difluorometilornitina se ha usado para potenciar el efecto del MGBG. Los bajos niveles intracelulares de poliaminas que resultan del tratamiento con difluorometilornitina aumentan grandemente la incorporación del MGBG; tanto el MGBG y las poliaminas usan el mismo sistema de incorporación, el cual es inducido por los niveles bajos de poliaminas[79].

La adenosilmetionina descarboxilada es un potente inhibidor de la adenosilmetionina descarboxilasa. Algunos compuestos sintéticos que tienen una estructura similar a la adenosilmetionina o a la adenosilmetionina descarboxilada, son también inhibidores, pero los efectos son menos importantes.

4.5.3. Inhibidores de la espermidina sintetasa y espermina sintetasa.

La ciclohexilamina, diciticlohexilamina y un análogo de transición, S-adenosil-1'8-diamino-3-tiooctano, son fuertes inhibidores de la espermidina sintetasa de mamíferos; sin embargo, estos compuestos tienen poco efecto sobre la espermina sintetasa. No se han descrito inhibidores específicos para espermina sintetasa, sin embargo, la 5'-metiltioadenosina, 5'-metiltiotubercidina, y el ácido aurintricarboxílico, inhiben tanto a la espermidina sintetasa como a la espermina sintetasa. Las aminopropil-transferasas bacterianas son inhibidas por S-adenosil-1'8-diamino-3-tiooctano y por diciticlohexilamina. La espermidina sintetasa también exhibe alguna inhibición del sustrato por S-adenosilmetionina descarboxilada, lo cual complica los estudios cinéticos de esta enzima [85].

4.6. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PROTEINAS.

4.6.1. Recambio rápido de ornitina descarboxilasa.

La característica más notable de la ornitina descarboxilasa es su recambio rápido en tejidos de mamíferos y sus cambios rápidos que ocurren en sus niveles después de su exposición a una variedad de efectores positivos y negativos

"in vivo".

La tasa de recambio de la ornitina descarboxilasa en mamíferos es mucho más rápida que el de cualquier otra enzima en mamíferos; la vida media es de diez a treinta minutos. Aunque la mayor parte de datos se obtuvieron midiendo la actividad enzimática después de inhibir la síntesis proteica con ciclohexamida, experimentos recientes han mostrado que hay un recambio comparable en la cantidad de proteína-enzima. En estos experimentos la pérdida de la proteína-enzima se midió por la pérdida de material inmunorreactivo y por desaparición de la proteína que había sido marcada con difluormetilornitina radioactivo. Ya que los datos son consistentes con una degradación proteolítica de ornitina descarboxilasa, es interesante que las proteínas con puntos isoeléctricos ácidos se degradan más rápidamente "in vivo"; la ornitina descarboxilasa tiene el punto isoeléctrico ácido más alto de las proteínas estudiadas así como el más corto tiempo de vida media[26].

Un gran número de estímulos causa una elevación rápida de diez a doscientas veces el nivel de ornitina descarboxilasa; tanto "in vivo" como en cultivos de células de mamíferos. Algunos de los estímulos más efectivos son hepatectomía, hormonas como la de crecimiento, corticosteroides y testosterona, factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico, cambios en el contenido iónico

del medio, activación de linfocitos, transformación de células cultivadas, adición de suero fresco para mantener a las células latentes y el tratamiento con promotores tumorales como los ésteres forbòlicos[73].

Un ejemplo de los efectos observados lo constituye el estudio sobre el aumento de los niveles de ornitina descarboxilasa en hígado de ratón después de la administración de testosterona. La cantidad de ornitina descarboxilasa aumentan unas horas después de la inyección de testosterona; después de cinco días de tratamiento el incremento en la actividad de la enzima es de 600 veces más en la corteza renal. El efecto no se notó con ratones que presentaron el síndrome de feminización testicular, es decir, el efecto no se observa si no hay receptores funcionales de andrógenos. Estos efectos concuerdan con el hallazgo de que en riñones de ratones machos no tratados, tienen niveles doce veces más altos a los niveles de ornitina descarboxilasa que las hembras no tratadas. Es importante hacer notar que este no es el único efecto de la testosterona sobre el riñón; los andrógenos también causan hipertròfia renal, aumento en la síntesis de proteínas, aumento en la actividad de la β -glucuronidasa, alcohol deshidrogenasa y algunas otras enzimas; estos cambios, sin embargo, son menos rápidos que aquellos que se notan con la ornitina descarboxilasa[21].

El aumento en la actividad de la ornitina descarboxilasa en respuesta al tratamiento con andrògenos, así como la elevación que se nota después de otros estímulos, es el resultado de un aumento de la proteína-enzima más que una modificación post-transcripcional, activación, o inhibición de la enzima; los cambios en la proteína ornitina descarboxilasa en estos experimentos fueron medidos por métodos inmunquímicos y marcado con difluormetilornitina radiactiva. El nivel en la cantidad de ornitina descarboxilasa es el resultado de un aumento en la estabilidad de la enzima; es decir, la vida media aumenta de cuatro a diez veces y de una mayor síntesis de la enzima en el mRNA para la ornitina descarboxilasa después del tratamiento con andrògenos [47].

El rápido recambio de la ornitina descarboxilasa puede tener una razón fisiológica importante por su respuesta rápida a una variedad de estímulos. Berlin y Schmike claramente indicaron que si hay un aumento general en la síntesis proteica, el nivel de una enzima en particular aumenta mucho más rápidamente que si la enzima tiene una tasa de recambio rápido. Es obvio que una enzima con una velocidad muy rápida de síntesis y una tasa de degradación alta, es decir, un alto recambio, responderá rápidamente a la inhibición de la degradación proteica o a la estimulación de la síntesis de proteínas. Por lo que no es sorprendente que una amplia variedad de estímulos cause un rápido aumento

en los niveles de ornitina descarboxilasa. Hasta ahora no hay una razón para establecer definitivamente que los efectos observados representan un efecto específico sobre la ornitina descarboxilasa; lo más probable es que los cambios en la ornitina descarboxilasa reflejen más dramáticamente los efectos de los estímulos de crecimiento sobre la biosíntesis de proteínas en general[73].

Al contrario de la enzima de los tejidos de mamíferos, la ornitina descarboxilasa en la levadura tiene una vida media más larga y no hay evidencias para un recambio de la enzima en el crecimiento logarítmico de la *Escherichia coli*. El mecanismo de control de estas enzimas no ha sido estudiado en detalle, pero se ha descrito en bacterias un posible papel del AMP cíclico y nucleótidos de guanina como GTP y ppGpp, y antienzimas sobre la regulación de ornitina descarboxilasa[3].

4.6.2. Control de la ornitina descarboxilasa por antienzimas.

Un nuevo tipo de control negativo de la ornitina descarboxilasa puede ser dado por una o más proteínas inhibidoras, que son inducidas por la administración de 1'3-diaminopropano, putrescina, espermina, espermidina o por la adición de ellos a células de cultivo bacterianos. Estas proteínas han sido llamadas antienzimas de la ornitina

descarboxilasa. Las antienzimas tienen una alta afinidad por la enzima e inhiben a la enzima por una unión no covalente. Esta interacción proteína-proteína es reversible por altas cantidades de sales, y la enzima activa puede ser recuperada por tratamientos con elevadas cantidades de sales.

Aunque este tipo de control por interacción proteína-proteína no es común en otros sistemas bioquímicos, existe información para tal inhibición como la interacción de tripsina y el inhibidor de tripsina de soya, y de la interacción de subunidades catalíticas regulatorias. Las antienzimas han sido descritas de varias fuentes incluyendo *Escherichia coli*, cultivos de células de mamíferos y varios tejidos animales después de la administración de aminos "in vivo"[3].

Dos pequeñas proteínas básicas y una proteína ácida con actividad de antienzima, han sido purificadas hasta homogeneidad de *Escherichia coli*. Se ha descrito una purificación parcial de antienzima de hígado de rata. Por otro lado, una "proteína activadora" o "anti-enzima" ha sido purificada de *Escherichia coli* y de hígado de rata. Esta "anti-enzima" es capaz de aumentar la actividad de la ornitina descarboxilasa "in vitro" en una mezcla que contenga ornitina descarboxilasa y antienzima. La "anti-enzima" produce alteraciones no conocidas en la ornitina descarboxilasa, pero debido a su alta afinidad por la

antienzima puede liberar a la ornitina descarboxilasa activa de su forma compleja inactiva. En algunos extractos, la cantidad de ornitina descarboxilasa activa depende no solo de la cantidad de la enzima, sino de la cantidad de antienzima, la cual inhibe a la enzima y de la cantidad de la "anti-antienzima", la cual se une a la antienzima liberando a la ornitina descarboxilasa activa [73,3].

El papel "in vivo" de estas interacciones es incierto. Por ejemplo, la remoción de la inhibición de la antienzima no explica el aumento en la actividad de la ornitina descarboxilasa después del tratamiento con andrógenos, ya que hay un aumento en la cantidad de proteína-enzima medida inmunológicamente.

4.6.3. Control de la ornitina descarboxilasa por modificación post-traducción.

4.6.3.1. Pérdida de la actividad después de crecimiento en aminos.

En experimentos con *Saccharomyces cerevisiae*, la actividad de la ornitina descarboxilasa se pierde casi completamente después de cuatro horas de crecimiento en un medio que contiene espermina y espermidina. La proteína-enzima sin embargo, no disminuye cuando se prueba por immuno-

precipitación y su peso molecular no cambia. Esto indica que alguna modificación post-traduccion aún no conocida ocurre, lo cual evita la actividad enzimática sin ninguna degradación de la proteína. No existe evidencia para una antienzima o para una unión covalente de aminos a la proteína-enzima[48].

En *Phisarum policephalum* una modificación post-traduccion parece ser importante en la disminucion de la actividad de la ornitina descarboxilasa, observada después de un crecimiento medio que contiene aminos. La forma A de la ornitina descarboxilasa, la cual tiene un Km bajo para el fosfato de piridoxal, es convertida a la forma B con un Km alto, por una proteína modificadora que es inducida por crecimiento de los organismos en presencia de aminos[73].

4.6.3.2. Baja de la actividad por fosforilación "in vitro".

Una proteína-cinasa [21,000D.] copurifica con ornitina descarboxilasa de *Phisarum nucleoli* [71,000 D.]. Esta proteína-cinasa muestra una fosforilación específica dependiente de poliamina para la ornitina descarboxilasa. Aunque se han hecho especulaciones interesantes sobre la importancia fisiológica de la fosforilación de la ornitina descarboxilasa. Este papel "in vivo" es incierto[31].

4.6.3.3. Pèrdua de la activitat per transamidaci3n "in vitro".

Otra modificaci3n post-traducci3n que puede inactivar a la ornitina descarboxilasa, es la acci3n de la transglutaminasa para formar una uni3n covalente entre las aminas y la ornitina descarboxilasa. Aunque esta reacci3n ha sido descrita "in vitro" para la ornitina descarboxilasa de hígado de carnero, su importancia "in vivo" se desconoce. Algunas correlaciones se han hecho entre los cambios en los niveles de transglutaminasa y los cambios en la ornitina descarboxilasa "in vivo", pero una directa interacci3n no se ha demostrado "in vivo". La ausencia de incorporaci3n de aminas durante la inactivaci3n de la ornitina descarboxilasa en *Saccharomyces cerevisiae* o *Phisarium policephalum* despuès de crecimiento en cultivos con suplementos de poliaminas, mostr3 que la transamidaci3n no explica la pèrdua observada de la ornitina descarboxilasa en estos experimentos[48].

4.6.4. Amplificaci3n gènica.

Como se discuti3 anteriormente, una lnea celular de linfoma mutante se seleccion3 debido a su marcada sobreproducci3n de ornitina descarboxilasa. La cèlula mutante es tetrapl3ide y dos de sus cuatro cromosomas XIV contienen grandes regiones que se tiñen homogèneamente, un hallazgo

que evidencia la presencia de regiones de amplificación génica. En acuerdo con estas observaciones hay un aumento en la cantidad de mRNA correspondiente [22].

4.6.5. Regulación de adenosilmetionina descarboxilasa.

La actividad de la adenosilmetionina descarboxilasa en mamíferos aumenta por muchos de los estímulos que causan un aumento en la ornitina descarboxilasa, pero las respuestas no son tan grandes o rápidas. La adenosilmetionina descarboxilasa tiene una vida media corta cuando se ensaya ya sea por pérdida de la actividad o como proteína inmunoreactiva [cerca de una hora en tejidos de mamíferos y no tan corta como la ornitina descarboxilasa]. Los niveles de la adenosilmetionina descarboxilasa en mamíferos aumenta notablemente después de la administración de metilgloxal bis[guanilhidrazona], ya sea en animales o en cultivos celulares. En presencia de este inhibidor la vida media de la enzima se aumenta parcialmente, por baja en su degradación [73].

Los niveles de adenosilmetionina descarboxilasa disminuyen si se añade espermidina al medio de cultivo, y aumentan si los niveles de espermidina son disminuidos, tal como sucede después de la adición de metilgloxal bis [guanilhidrazona] o difluormetilornitina. El mecanismo de

este control por espermidina no es claro, algunos autores sugieren un control transcripcional, y otros un control post-traducción.

La adenosilmetionina descarboxilasa en mamíferos es notablemente activada por la putrescina y es inhibida por adenosilmetionina descarboxilasa. Se ha mostrado que la adenosilmetionina descarboxilasa se acumula en células, si la biosíntesis de la putrescina se inhibe [22].

4.6.6. Papel de la arginasa.

En la mayoría de los tejidos eucariotes, excepto plantas la putrescina se pudo formar únicamente de ornitina; por lo tanto, el control en la formación de ornitina es más importante en la regulación de los niveles de putrescina. En células de mamíferos, por ejemplo, la ornitina solamente puede ser formada por la acción de la arginasa sobre arginina exógena. La importancia de la arginasa se demostró claramente por requerimientos de poliaminas en mutantes de células de ovario de hamsters chinos, y de *Neurospora crassa*, en la cual el defecto no está en la ornitina descarboxilasa sino en arginasa.

Algunos de los efectos del suero en cultivos celulares para estimulación de crecimiento, pueden ser dados o debidos

al contenido de arginina y arginasa. No obstante, un estudio de una variedad de líneas celulares no mostraron una correlación directa entre los niveles de arginasa y la habilidad a crecer en un medio libre de suero.

Algunos trabajos han indicado, la importancia potencial de la arginasa en la regulación de la cantidad disponible de ornitina descarboxilasa para la biosíntesis de putrescina, como se ha ido demostrando en cultivos de células epiteliales de mamíferos: el mismo estímulo que aumenta los niveles de ornitina descarboxilasa, aumenta los niveles de arginasa [64].

4.7. MUTANTES EN LA VIA BIOSINTETICA.

Un logro importante en el área de las poliaminas ha sido la selección de mutantes en células, tanto en procariotes como en eucariotes, ya sea por sus defectos de enzimas en los pasos biosintéticos o por sobreproducción de estas enzimas. Los mutantes que no pierden las enzimas biosintéticas son de gran valor para el estudio de los efectos bioquímicos y fisiológicos de privación intracelular de poliaminas. Los mutantes que sobreproducen dichas enzimas, facilitan las investigaciones sobre la estructura de las proteínas y su regulación fisiológica.

4.7.1. Escherichia coli.

Las mutaciones de punto se encontraron primero en los genes de la ornitina descarboxilasa [spe C], arginina descarboxilasa [spe A], agmatina ureohirolasa [spe B], adenosilmetionina descarboxilasa [spe D]. Posteriormente las mutaciones por delección se obtuvieron en estos genes.

El mapeo gènico en Escherichia coli para estos genes es como sigue: 63.4 [spe C], 62.8 [spe A], 62.7 [spe B] y 2.7 min para [spe D] sobre el mapa genètico de Escherichia coli [17,89].

El gen para adenosilmetionina transferasa [met K], està entre los mapas spe B y spe C. Mutaciones de punto tambièn se han obtenido en el gen que codifica para lisina descarboxilasa [cad A a 92 min]; y en el gen que regula esta enzima [cad R a 46 min]. Esta ùltima mutaciòn puede ser la misma que Lys P [resistencia de tiosina]. No se han descrito mutaciones en el gen que codifica para putrescina aminopropil transferasa, su posiciòn en el mapa se desconoce [84].

Las cepas que contienen cinco mutaciones [spe A, spe B, spe C, cad A] no tienen aminas cuando crecen en un medio mìnimo, pero pueden crecer indefinidamente a un tercio de su tasa de crecimiento cuando al medio se le agregan

poliaminas. Las cepas deficientes en la biosíntesis de poliaminas han sido utilizadas para estudios sobre los efectos fisiológicos de deprivación de poliaminas "in vivo".

[84]

Algunos mutantes con un requerimiento absoluto de poliaminas para el crecimiento, se ha obtenido para transducción de ciertos alelos rps 1 [str A] en cepas portadoras de las mutaciones antes señaladas. Uno de estos mutantes mostró un absoluto requerimiento de poliaminas, solo si la temperatura para crecimiento se elevò a 42^oC [es decir, un requerimiento de poliaminas dependiente de la temperatura]. Debido a que la mutación rps 1 està en la proteína ribosomal 12S, los cambios en la estructura ribosomal o conformacional son los supuestos responsables para el desarrollo de un requerimiento absoluto de poliaminas[83].

Despuès de un largo periodo de deprivación de poliaminas unos cuantos mutantes supresores fueron seleccionados, los cuales pueden crecer lentamente en ausencia de aminas.

4.7.2. *Saccharomyces cerevisiae*.

4.7.2.1. Mutaciones de la ornitina descarboxilasa.

Se han obtenido de *Saccharomyces cerevisiae* para cada uno de los pasos en la biosíntesis de poliaminas.

Debido a que *Saccharomyces cerevisiae* solo produce putrescina a partir de ornitina [es decir, no tiene arginina descarboxilasa], las cepas que no tienen ornitina descarboxilasa, no pueden sintetizar putrescina y consecuentemente no producen espermidina o espermina. Sin la adición de poliaminas, dos de estas cepas no mostraron crecimiento y otras mostraron un crecimiento marcadamente lento [74].

Los diez mutantes aislados en el laboratorio de Tabor, parecen estar en el mismo gen [spe 10], y los mutantes son recesivos; la localización cromosómica no se conoce.

4.7.2.2. Mutaciones de la adenosilmetionina descarboxilasa.

Se han aislado cepas con mutaciones en el gen que codifica para adenosilmetionina descarboxilasa [spe 2]. Debido a que estos mutantes son incapaces de producir adenosilmetionina descarboxilasa, carecen de espermina y espermidina; los mutantes de spe 2 tienen cantidades

aumentadas de ornitina descarboxilasa y putrescina. Las mutaciones spe 2 son recesivas y el mapa està cercano al locus de arg 1 en el cromosoma XV[36].

4.7.2.3. Mutaciones de putrescina, aminopropiltransferasa y espermidina aminopropiltransferasa.

Se ha encontrado que los mutantes tienen la necesidad de putrescina aminopropiltransferasa [spe 3] y espermidina aminopropiltransferasa spe 4 [el gen estructural] y spe 40 [un gen regulador]; los mutantes spe 4 y spe 40 se aislaron en subcultivos de cultivos de una cepa spe 10 desnaturalizada mediante la incubación prolongada en medio libre de amina. Los mutantes spe 10 y spe 40 crecieron a una tasa casi de tipo silvestre y tuvieron niveles casi normales de ornitina descarboxilasa y putrescina[74].

Los mutantes spe 10 y spe 4 tienen poca ornitina descarboxilasa o putrescina detectable pero han recobrado la habilidad de crecer a un sexto de la tasa de tipo silvestre.

Aunque la localización cromosómica exacta se desconoce, el mapa de las mutaciones de spe 40, o es el mismo, o està muy cercano a spe 10. El gen estructural spe 4 no està ligado a spe 40 [regulador] y su posición cromosómica no se conoce. El spe 40 es una mutación dominante, el spe 4 es

recesiva. La habilidad de los mutantes spe 4 y spe 40 para desviar las mutaciones spe 10, indican un complicado, pero aún desconocido sistema de regulación para la ornitina descarboxilasa en levaduras[74].

Se han descrito mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que sobreproducen ornitina descarboxilasa, al parecer por derrepresión, pero estas cepas no han sido estudiadas en detalle[74].

4.7.3. *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*.

Se han descrito mutantes que carecen de ornitina descarboxilasa en *Neurospora crassa*. Estas cepas carecen de putrescina, y no crecen a menos que se les añada putrescina, espermina y espermidina. La deficiencia de putrescina también ocurre en un mutante que no puede sintetizar ornitina, por ejemplo un mutante de arginasa en el cual la biosíntesis de la ornitina está reprimida por arginina agregada[42].

Los mutantes que requieren putrescina han sido obtenidos en *Aspergillus nidulans*, pero los defectos enzimáticos no han sido estudiados.

4.7.4. Otros microorganismos.

En trabajos recientes, se ha visto que la putrescina estimula el crecimiento de algunos microorganismos, incluyendo el *Lactobacillus casei*, *Pasteurella tularensis*, *Neisseria perflava* y *Haemophilus parainfluenzae*. Sin embargo no se conoce en la mayoría de los casos, si los efectos son dados para reemplazar la deficiencia de poliaminas como resultado de mutaciones en la vía biosintética, o a una inestabilidad de membranas por poliaminas[73].

4.7.5. Células de mamíferos.

Por una técnica "suicida" con [³H] ornitina, se han obtenido mutantes en cultivo de células de ovario de Hamsters chinos que carecen de ornitina descarboxilasa, y es por ello que la putrescina no es sintetizada, estas células no pueden crecer a menos que se añada putrescina al medio [81].

Se han descrito mutantes de células de mamíferos que requieren de putrescina para crecer, pero no tienen un defecto en ornitina descarboxilasa. Estas células carecen de arginasa, debido a que la ornitina solo puede ser sintetizada en estas células únicamente por arginina, las células desarrollan una deficiencia de aminas y no pueden

crecer a menos que el medio contenga ornitina exògena. Se han obtenido mutantes que sobreproducen ornitina descarboxilasa despuès de crecer en presencia de inhibidores de la ornitina descarboxilasa como α -metilornitina o la difluormetilornitina. En una de estas cepas la ornitina descarboxilasa representa el 15% de la proteina total [61].

4.7.6. Clonaciòn de genes de la via biosintètica.

Los genes de *Escherichia coli* para spe A, spe B, spe C, spe D, y cad A, han sido clonados en plàsmidos; las cèlulas transformadas con esos plàsmidos sobreproducen las enzimas respectivas. Se han descrito genes de mamíferos clonados para ornitina descarboxilasa en plàsmidos de *Escherichia coli* [6,47].

4.8. FUNCIONES DE LAS POLIAMINAS.

4.8.1. Requerimientos en crecimiento y desarrollo.

Las poliaminas se requieren para el crecimiento óptimo celular, para la mayoría de las células este requerimiento es absoluto. Otros estudios [principalmente con células de mamíferos] han mostrado que las células de crecimiento rápido tienen niveles más altos de ornitina descarboxilasa y poliaminas que las células de crecimiento lento y latentes.

Cuando las células son estimuladas, los niveles de ornitina descarboxilasa y poliaminas, generalmente se elevan antes de que aumente el contenido de DNA, RNA y/o proteínas [21,80,63, 59,88,35].

Sin embargo, aunque resulta evidente que las poliaminas se requieren para un crecimiento óptimo, es muy difícil evaluar cuales sistemas bioquímicos específicos son directamente afectados por la presencia o ausencia de poliaminas [16].

Además, debido a que muchos procesos se afectan por estimulación o inhibición del crecimiento; una relación causal directa entre poliaminas y algunos otros sistemas bioquímicos específicos es difícil de evaluar. Por ejemplo, la inhibición de crecimiento celular [por cualquier otra razón], necesariamente da como resultado una disminución en

el DNA, RNA, y en la síntesis de proteínas, pudiendo existir muchos pasos entre el efecto primario de las poliaminas y la síntesis de estas macromoléculas. Los experimentos sobre los efectos de la privación de poliaminas son particularmente difíciles de interpretar, debido a que la privación de poliaminas no ocurre rápidamente, es decir, mientras que el "pool" andrògeno se agota, muchos cambios pueden ocurrir. Objeciones similares se aplican a experimentos diseñados para ensayar los postulados de que el crecimiento estimulado directamente, induce un aumento en la ornitina descarboxilasa y que este aumento sea directamente responsable de la iniciación de la síntesis de DNA, RNA y crecimiento, probablemente via un incremento en poliaminas[73].

Por otra parte, se sabe que en fibroblastos las poliaminas actúan como reguladores de la traducción del mRNA que codifica para S-adenosilmetionina descarboxilasa. Esta traducción está controlada por señales mitogénicas en linfocitos T indicándose que este control lo ejecutan las poliaminas durante la etapa de iniciación de ese proceso [88].

También se reporta que la espermidina y espermina en concentraciones submilimolares estimulan la tasa de incorporación de aminoácidos a proteínas en células de diversos sistemas[28].

Siendo marcados estos efectos en la iniciación y elongación de la síntesis de globinas. Un exceso de las poliaminas referente a una disminución de incorporación de aminoácidos durante la síntesis de proteínas, con la característica de no ser uniformes los efectos, por lo que se reportan efectos diversos durante la síntesis de proteínas de las poliaminas[28].

El EF-3 es un factor de elongación de translación específico en levaduras y hongos; la región carboxitermal del mismo es la responsable de la interacción con ribosomas; inhibidores de esta interacción son poliaminoácidos acídicos, poly-L-ASP y poly-L-GLU[86].

También se ha detectado que una poliamina poco frecuente [cuaternaria] TETRAKIS [3-amino propil amonio] inhibe la síntesis de fenilalanil-tRNA[87].

Existen mayores complicaciones al tratar de explicar los experimentos en relación a la importancia de las poliaminas en la diferenciación. Las poliaminas están claramente comprometidas en algunos sistemas en forma similar al efecto de las hormonas sobre la producción de caseína y lactoalbúmina, en trasplantes de tejido mamario, pero en otros sistemas los efectos de las poliaminas en diferenciación parece ser secundaria a sus efectos sobre proliferación[59,62].

Varios estudios han postulado un papel directo del AMP-cíclico en los efectos de inhibición del crecimiento por privación de poliaminas, o un papel intermedio de las poliaminas en la acción del AMP-cíclico. Sin embargo, se tienen evidencias en contra del papel del AMP-cíclico en cultivos de células de linfoma de ratón [13].

Sin embargo, se sabe recientemente que el AMP-cíclico como mensajero secundario intracelular [el cual se produce como respuesta a la interacción de una molécula mensajero sobre un receptor proteico], puede actuar al igual que el Ca^{+2} , IP_3 y DG. Y que estos compuestos activan fosfoquinasas como: AMPc-cinasa, proteína-cinasa C y proteína-cinasa II [CAM-cinasa II]. La actividad de estas enzimas es afectada por poliaminas, fundamentalmente inhibiéndose.

Por otra parte, otras enzimas del grupo de las cinasas que no son activadas por los nucleótidos cíclicos o Ca^{+2} , son estimuladas por poliaminas [16].

Un sistema particularmente interesante es la estimulación de la diferenciación por diaminas diacetiladas [especialmente diacetilamino hexano], pero no hay información sobre el mecanismo de esta reacción, o de su relación, o si es una función normal de las poliaminas.

Varios estudios han postulado un papel directo del AMP-cíclico en los efectos de inhibición del crecimiento por privación de poliaminas, o un papel intermedio de las poliaminas en la acción del AMP-cíclico. Sin embargo, se tienen evidencias en contra del papel del AMP-cíclico en cultivos de células de linfoma de ratón [13].

Sin embargo, se sabe recientemente que el AMP-cíclico como mensajero secundario intracelular [el cual se produce como respuesta a la interacción de una molécula mensajero sobre un receptor proteico], puede actuar al igual que el Ca^{+2} , IP_3 y DG. Y que estos compuestos activan fosfoquinasas como: AMPc-kinasa, proteína-kinasa C y proteína-kinasa II [CAM-kinasa II]. La actividad de estas enzimas es afectada por poliaminas, fundamentalmente inhibiéndose.

Por otra parte, otras enzimas del grupo de las cinasas que no son activadas por los nucleótidos cíclicos o Ca^{+2} , son estimuladas por poliaminas [16].

Un sistema particularmente interesante es la estimulación de la diferenciación por diaminas diacetiladas [especialmente diacetilamino hexano], pero no hay información sobre el mecanismo de esta reacción, o de su relación, o si es una función normal de las poliaminas.

4.8.2. Interacciòn de las poliaminas con DNA.

4.8.2.1. Estudios "in vivo" sobre la interacciòn de poliaminas y DNA.

Los niveles de ornitina descarboxilasa y de aminos han sido medidos en diferentes fases del ciclo celular en células sincronizadas. Los niveles son más altos en el final de la fase G, se sugiere que estos cambios sean necesarios para la preparaciòn de la célula en su síntesis de DNA. En otros estudios con células de mamíferos, las poliaminas han mostrado afectar el inicio de la síntesis de DNA[35,78].

En estudios con mutantes de Escherichia coli deficiente en poliaminas, las poliaminas han mostrado afectar la velocidad del proceso de duplicaciòn del DNA más que la iniciaciòn de la síntesis de este. Estos resultados indicarian un efecto independiente de la tasa baja de crecimiento, ya que los cambios en la velocidad de este usualmente afectan la iniciaciòn de la traducciòn más que el proceso de la duplicaciòn[59,62,88].

En células de càncer mamario, se ha encontrado un incremento en la biosíntesis de poliaminas, así como una resistencia a la terapìa con fármacos que las inhiben[59].

Otros estudios "in vivo" se refieren a la presencia de poliaminas en el DNA de bacteriófagos y virus. Tanto el bacteriófago T y el virus herpes contienen poliaminas en una forma no intercambiable en el virus maduro. Además, es importante que los mutantes de *Escherichia coli* que no pueden sintetizar poliaminas, produzcan cantidades normales del fago; estos fagos no contienen aminos, indicando que es posible que algún otro catión es capaz de sustituir a las poliaminas. Por otro lado, el bacteriófago no puede ser formado en mutantes que requieren poliaminas, ya sea después de la inducción Lisogénica o después de la infección. La razón para este defecto en la producción de , y en ausencia de poliaminas no es clara, el defecto no resulta de un requerimiento de aminos para integración o escisión, aunque estudios "in vitro" han mostrado una estimulación de estas reacciones por las aminos[2].

La duda sobre si las poliaminas están localizadas en el núcleo "in vivo", permanece. Esta cuestión es difícil de contestar debido a que después de la lisis, ocurre una redistribución de las poliaminas en las células, y la distribución observada, no necesariamente refleja la distribución "in vivo". Algunos intentos se han hecho para averiguar tal distribución mediante procedimientos de aislamiento rápido. Sin embargo, con estos procedimientos es muy difícil seguir la redistribución de las poliaminas durante el aislamiento de los componentes celulares, no se

puede asegurar la localización intracelular de las poliaminas [57].

Se encontró un enlace covalente de la putrescina al DNA en el bacteriófago ϕ W-14 de Pseudomona. En este fago una pirimidina hipermodificadora, α -putrescínil timina, está unida covalentemente al hidroximetil uracilo, a nivel de polinucleótido.

4.8.2.2. Estudios "in vitro" sobre la interacción de poliaminas y DNA.

Se demostró la interacción de poliaminas y DNA, por la habilidad de la espermina y espermidina para precipitar DNA, ya que protegen al DNA de la desnaturalización por calor o por agitación, así mismo por estudios de difracción de rayos X en complejos poliamina-DNA. Los efectos estabilizadores fueron atribuidos a la neutralización de las cargas negativas sobre los grupos fosfato, con el consiguiente aumento en la baja de varias fuerzas de atracción. Se sugiere que, "in vivo", en presencia de poliaminas, el DNA no puede estar en solución, sino debe estar en algún tipo de complejos precipitados. Estos estudios han sido ampliados y cuantificados y mostraron ser consistentes con las teorías de contracorriente iónica de Manning. La condensación ocurre más bien repentinamente cuando casi el 90% de las cargas

negativas han sido neutralizadas. Apoyando el concepto de que las aminas actúan por un efecto de contracorriente iónica, más que por cualquier especificidad directa de la cadena carbón-nitrógeno, se desprende del hallazgo de un efecto similar con cationes trivalentes inorgánicos como el $\text{CO}^{+3} [\text{NH}_4]_6$ y que no están estructuralmente relacionados con espermidina o espermina[92].

Se ha sugerido que en soluciones diluidas de DNA, las poliaminas interactúan con moléculas individuales de DNA más que por dos puentes o con más moléculas. Estudios recientes han definido y confirmado esta sugerencia, usando técnicas como difracción lineal y dispersión de luz. Cuando las soluciones diluidas de DNA se tratan con espermidina o espermidina bajo condiciones controladas de fuerza iónica, ocurre una condensación coordinada, resultado de la compactación de moléculas individuales de DNA, más que por una agregación gruesa. En el microscopio electrónico se observan bastones, esferas, collarines y algunos agregados intramoleculares más complicados dependiendo de las concentraciones de DNA y poliaminas, así como de los procedimientos usados para la preparación de los especímenes para el microscopio electrónico. El examen de nucleasa de *micrococcus* mostró que el DNA compactado tiene una organización definida con ligamentos presentes de nucleasa-sensible solo a intervalos definidos. Algunos estudios han señalado la similitud entre la apariencia de estas estructuras de

poliamina-DNA en el microscòpio electrònic, con las que se han obtenido con materiales naturales como los virus. Una indicaciòn de la posible relevancia fisiològica de estas interacciones poliamina-DNA, es que la concentraciòn de espermidina o $\text{CO}^{+3}[\text{NH}_4]_6$ necesario para precipitar el DNA, son similares a aquellas que se necesitan para la formaciòn de la cadena de DNA superhelicoidal por girasa. Se ha sugerido que la compactaciòn de DNA por cationes polivalentes se requiere para algunas reacciones enzimáticas así como para el empaquetado de DNA en cabezas de fago[45,92].

Hay un aumento en la conversiòn de DNA-B a DNA-Z en presencia de una concentraciòn baja en poliaminas; efectos similares pueden obtenerse de cualquier manera con cationes divalentes a mäs altas concentraciones o con $\text{CO}^{+3}[\text{NH}_4]_6$. Se ha realizado considerable trabajo con tènicas de rayos X y dicroïsmo circular sobre el efecto de las poliaminas en la interconversiòn de las formas A y B; sin embargo, los resultados difieren de las condiciones experimentales.

La interacciòn entre àcidos nucleïccs y poliaminas, tambièn se ha estudiado midiendo las constantes de protonaciòn y marcado de $^{13}\text{C-NMR}$ y $^{23}\text{Na-NMR}$.

Se ha descrito que las poliaminas estimulan o inhiben varias enzimas con la sïntesis o el metabolismo del DNA. Sin embargo, ninguno provee pruebas definitivas de que los

efectos observados también ocurran "in vivo". La evaluación de la mayor parte de estos experimentos es difícil debido a que la espermidina o espermina pueden reaccionar con el sustrato o con el producto, así como con la enzima misma; frecuentemente las poliaminas parecen estar presentes en concentraciones suficientes para precipitar el sustrato o el producto. En algunos casos, cuando se usaron las preparaciones incompletamente purificadas de la enzima, una posterior purificación mostró que el efecto de las poliaminas es secundario a la inhibición por las poliaminas de enzimas contaminantes como ATPasas o nucleasas. Hay algunos ejemplos de los efectos de las poliaminas sobre enzimas purificadas, pero los mismos efectos usualmente se obtienen con concentraciones más altas de Mg^{2+} o Ca^{2+} [7].

4.8.3. Interacción de poliaminas con RNA.

4.8.3.1. Poliaminas y síntesis de RNA.

Niveles intracelulares de poliaminas y de ornitina descarboxilasa se aumentan marcadamente cuando se estimula la síntesis de RNA. Un ejemplo dramático es la estimulación cien veces mayor de la ornitina descarboxilasa en riñón después de que son administrados andrógenos a machos castrados o a ratones hembras. Este efecto es particularmente notable debido a que después de la

estimulación de andrógenos, los niveles de RNA aumentan dramáticamente, mientras solo hay un pequeño aumento en el contenido de DNA.

Estos y otros resultados han llevado a especulaciones considerables sobre el papel de las poliaminas en la síntesis y metabolismo de RNA. Por ejemplo, un estudio mostró una doble estimulación de la síntesis del RNA ribosomal, cuando la ornitina descarboxilasa se inyectó en oocitos de *Xenopus*; lo cual realizó la sugerencia de que la ornitina descarboxilasa es la proteína que regula el inicio de la síntesis de RNA. En otros estudios la ornitina descarboxilasa nucleolar se purificó de *Physarum polycephalum* y se presentaron evidencias en el sentido de que después de la fosforilación esta proteína es la misma fosfoproteína que estimula la transcripción de los genes ribosomales. Sin embargo, todavía, no es posible atribuir una relación causal directa entre el aumento de la ornitina descarboxilasa [y poliaminas] y el aumento en la síntesis de RNA. Es muy probable que ambos aumentos sean respuestas separadas a un estímulo primario [18,29].

La espermidina o espermina se requieren para el mantenimiento y duplicación de la doble-hélice de plásmidos de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica para una toxina letal es decir, estos plásmidos no tienen las mutaciones *spe*² y *spe*¹⁰, a menos que se añada espermidina o espermina al

medio. Sin embargo, debido a que muchos de los pasos comprometidos en la biosíntesis de estos plásmidos letales, no es posible atribuir este efecto de privación de espermidina a ningún paso sintético específico.

Se han encontrado poliaminas en el virus del mosaico del nabo amarillo, en el virus de encefalomiocarditis y en el bacteriófago R-17; está presente en el virus de la poliamina TYMV [principalmente espermidina] en una forma no intercambiable [75].

4.8.3.2. RNA de transferencia.

Existe especial interés en la unión de las poliaminas al tRNA y en la supuesta participación de la espermidina en la reacción de aminoacilación. En particular, algunos estudios muestran que las poliaminas pueden unirse a sitios específicos sobre la molécula de tRNA. De hecho la preparación de cristales de tRNA en rayos X de alta resolución se facilita enormemente en presencia de espermina [41,78].

Existen estudios sobre la unión de poliaminas al tRNA en solución, pero hay desacuerdo sobre la estereoquímica de la unión, y si hay o no coordinación en la unión. Estudios más recientes concluyeron que hay dos clases de sitios de

uniòn de la espermidina sobre el tRNA con fuerzas iònicas bajas, es decir, sitios de uniòn fuertes y dèbiles. Los iònes Na^+ y K^+ inhiben la uniòn de la espermidina, formando una atmosfera de contracorriente alrededor de las macromolèculas cargadas negativamente. Los autores enfatizan la importancia de correcciones para el efecto Donnan en medidas de equilibrio en diàlisis, concluyendo que sus datos parecen indicar una uniòn electrostàtica, sin evidencia para una uniòn covalente coordinada o cambios en el tRNA.

La proporciòn de protones intercambiables en el tRNA a temperaturas diferentes mostraron que las estructuras secundarias y terciarias son estabilizadas por espermidina o Mg^{2+} , se ha intentado definir las partes específicas de la molècula del tRNA que estàn comprometidas. En un estudio, la espermidina mostrò estabilizar la conformaciòn del rizo del anticodòn tRNA^{Trp} de la levadura, dando por resultado un aumento en el nùmero de sitios de uniòn fuerte para cationes[51].

La espermidina juega un papel importante en el procesamiento del tRNA, aumentando la extensiòn y el sitio preciso de la escisiòn de las secuencias intermedias del precursor de los tRNA por una endonucleasa asociada a membranas de levadura.

4.8.4. Poliaminas y biosíntesis de proteínas.

Diversos estudios han aparecido sobre la estimulación de la biosíntesis de proteínas por poliaminas "in vitro", y un número menor sobre los efectos de las poliaminas "in vivo". Los estudios "in vitro" se han relacionado con el efecto de las poliaminas sobre la producción global de la síntesis de proteínas, sobre la fidelidad de la traducción, y sobre pasos específicos como la síntesis de aminoacil-tRNA unión del aminoacil-tRNA y la iniciación y elongación de la cadena polipeptídica. En la mayoría de los estudios, pero no en todos, los efectos no son específicos y pueden ser reproducidos por cantidades mayores de cationes divalentes [28,59,62,87].

En la mayoría de los reportes sobre la efectividad de la espermidina o espermina sobre la síntesis de proteínas "in vitro", las poliaminas han sido adicionadas a otros componentes para preparar una mezcla que dé una fidelidad y actividad óptima. Generalmente la relación para las concentraciones de cationes divalentes no han sido definidas así mismo, el mecanismo de la estimulación no ha sido explicado. Sin embargo, en algunos casos el efecto ha mostrado consistir en uno de los pasos específicos en la biosíntesis de proteínas, como la integridad de los ribosomas o la unión del aminoacil-tRNA a los ribosomas.

4.8.4.1. Estimulación de la biosíntesis de polipéptidos "in vitro".

Como se revisò anteriormente, en presencia de concentraciones subòptimas de Mg^{2+} , las poliaminas estimulan marcadamente la actividad de algunos sistemas de síntesis de proteínas "in vitro". El efecto estimuladorio no se observò generalmente en presencia de concentraciones òptimas de Mg^{2+} sin embargo, en algunos casos las poliaminas causan alguna estimulación, aùn en presencia òptima de Mg^{2+} [33,59,65].

4.8.4.2. Efectos de las poliaminas sobre la disociación del ribosoma y estabilidad de las subunidades.

Es bien conocido que las poliaminas, así como el Mg^{2+} se enlazan al ribosoma y facilitan la asociación de las subunidades del ribosoma. Los ribosomas deficientes en poliaminas de *Escherichia coli*, son menos activos en un sistema de biosíntesis de proteínas que los ribosomas normales, aùn en presencia òptima de Mg^{2+} , el defecto parece estar en la subunidad ribosomal 30S. Los ribosomas defectuosos muestran disminuciòn en la metilaciòn de la subunidad 16S del RNA y en la cantidad de proteina S1 asociada con la subunidad ribosomal 30S.

En otros trabajos, la subunidad ribosomal 30S de *Bacillus subtilis* mostrò ser inestable en ausencia de espermidina; estas subunidades son catalizadas ya sea por el Mg^{2+} o por la espermidina; y los efectos estabilizantes se piensa sean el resultado de la inhibiciòn de la degradaciòn en la subunidad 16S del RNA ribosomal. La putrescina y la hidroxiputrescina [pero no la espermidina] estabilizan ribosomas de una especie de *Pseudomonas* en un sistema de síntesis "in vitro", pero el sitio específico afectado no se ha determinado[52].

4.8.4.3. Efectos de las poliaminas sobre la fidelidad de la traducciòn y sobre la terminaciòn de la cadena "in vitro".

Las poliaminas aumentan la fidelidad de la traducciòn manteniendo la concentraciòn de Mg^{2+} y la temperatura de incubaciòn más bajas; las poliaminas con alta concentraciòn de Mg^{2+} o a 37 °C; no tiene efecto o baja la fidelidad de la traducciòn. Similarmente, la espermidina protege de una lectura equivocada cuando se añade estreptomycinina o extracto de *Escherichia coli*. Las poliaminas son parte de la mezcla óptima de incubaciòn que se recomienda para los sistemas de traducciòn de proteínas "in vitro", a fin de aumentar la extensiòn y la fidelidad de la traducciòn.

Los pasos específicos responsables para este aumento en la fidelidad no son claros. Las poliaminas han mostrado mejorar la discriminación durante el enlace inicial del aminoacil-tRNA al ribosoma, así como en los subsecuentes pasos de corrección de lectura. Sin embargo, en algunos sistemas, por ejemplo *Escherichia coli*, las altas concentraciones de espermidina, así como altas concentraciones de Mg^{2+} disminuyen la habilidad del ribosoma para rechazar un complejo terciario no conocido, o un tRNA no conocido, dando como resultado una baja en la fidelidad.

Una posible participación de las poliaminas en la terminación de la cadena se deduce, por la menor longitud del polipéptido sintetizado "in vitro" en ausencia de aminos; sin embargo, en estos experimentos los efectos indirectos de las poliaminas como inhibición del rompimiento del mRNA, no se excluyeron. Más evidencias definitivas sobre el efecto de las poliaminas en la terminación de la cadena, viene de otros experimentos, los cuales mostraron que las poliaminas se requieren para la lectura de codones de terminación de la biosíntesis "in vitro" de hemoglobina y de proteínas asociadas con el bacteriófago QB y con el virus del mosaico del nabo amarillo[37].

4.8.4.4. Efectos de las poliaminas sobre la fidelidad de la traducción y sobre terminación de la cadena "in vivo".

La disponibilidad de mutantes de *Escherichia coli* carentes en aminos han permitido el estudio de los efectos de deprivación de poliaminas "in vivo"; los resultados han mostrado claramente que las poliaminas afectan la biosíntesis de proteínas "in vivo".

Los mutantes deficientes de *Escherichia coli* crecen a una tasa baja. En *Escherichia coli* mutadas hacen traducción en condiciones deficientes de poliaminas los organismos se vuelven completamente dependientes de estas para su crecimiento. Ya que la mutación resulta de una proteína defectuosa de la subunidad ribosomal 12S, la mejor explicación para este efecto es que la conformación o estabilidad del complejo ribosomal sintetizador de proteínas está adversamente afectado por una proteína ribosomal 12S anormal, especialmente si no están presentes las poliaminas. Este defecto puede ser reversible, cuando menos en parte con la adición de poliaminas.

La importancia de las poliaminas para la traducción "in vivo" se ha mostrado más directamente por experimentos que han demostrado que cepas con depleción en poliaminas de *Escherichia coli*, no pueden servir como huéspedes para

ciertos mutantes ámbar de fagos T₄ y T₇, si no se añaden poliaminas al medio, lo mismo ocurre si el huésped contiene una mutación supresora. La acumulación de un fragmento terminal ámbar puede demostrarse después de la infección de un huésped deficiente en poliaminas. De estos hallazgos, parece muy probable, que ante una deficiencia de poliaminas hay una conformación alterada del complejo sintetizador de proteínas del amino-tRNA ribosomal, y que este complejo modificado tiene reducida su habilidad para utilizar el supresor aminoacil-tRNA para leer el codón de alto [82,83].

4.8.4.5. Efectos de las poliaminas sobre la iniciación y elongación de la cadena de polipéptido "in vivo".

Los resultados en esta área no son claros, algunos experimentos indican un efecto de las poliaminas sobre iniciación de la cadena, mientras que otros indican que ellas afectan la elongación de la cadena, o ambos. Un reciente e interesante desarrollo es el haber encontrado que la hipusina, un derivado de la espermidina se une específicamente al factor de iniciación en los eucariotes; eIF-4D [34].

Poli-L-Asp ha sido comprobado su efecto como inhibidor de EF-3 [factor de elongación] [86].

4.8.4.6. Efectos de las poliaminas sobre las aminoacil-tRNA sintetetasas.

Estudios recientes han mostrado que, si bien la espermidina activa a algunas de las aminoacil-tRNA sintetetasas, con otras ni las estimula, ni las inhibe [53,87].

4.8.5. EFECTOS DE LAS POLIAMINAS SOBRE PROTEIN-CINASAS.

Algunas protein-cinasas independientes de AMP-cíclico se estimulan por poliaminas, pero el grado de estimulación varía marcadamente con diferentes preparaciones. Una de estas cinasas ha sido purificada a partir de núcleos de hepatocito de rata, y posee las características de una protein-cinasa NII; es independiente de AMP-cíclico y es marcadamente inhibida por heparina. Con esta preparación el requerimiento para espermidina o espermina está cerca de una absoluta dependencia sobre el sustrato usado, siendo mayor con caseína y RNA polimerasa I; por otro lado, con posvitina las aminos inhiben. El efecto estimulador de las poliaminas, se piensa sea dado por la proteína sustrato que se use, y que resulte de un incremento en la accesibilidad de los grupos treonina, los cuales son los sustratos preferidos para la fosforilación estimulada por aminos. Durante la purificación, la cinasa está íntimamente asociada con la RNA polimerasa I. En otros estudios con preparaciones

de hígado de rata y próstata ventral, hexaminas cobaltadas pudieron reemplazar a la poliamina en la actividad estimulante de cinasa, indicando que la neutralización de cargas es más importante para esta acción, que la estructura específica de la amina.

Otra proteína-cinasa independiente de AMP-cíclico activada por poliaminas, se purificò de nucleolos de *Phisarum policephalum* y estaba íntimamente asociada durante su purificación con ornitina descarboxilasa nucleolar. La ornitina descarboxilasa es particularmente un sustrato para esta cinasa, y se inactiva después de la fosforilación "in vitro". La actividad de esta cinasa fuè casi completamente dependiente sobre la espermidina adicionada[32,39].

El aislamiento de estas proteína-cinasas del núcleo, íntimamente asociadas durante la purificación, ya sea con RNA polimerasa I o con ornitina descarboxilasa, y su habilidad para fosforilar estas proteínas han guiado a interesantes especulaciones acerca del papel que tienen en la regulación del gen ribosomal y síntesis de RNA. Tal papel para poliaminas habia sido postulado previamente[32,39].

4.9. METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS.

4.9.1. Conversión de espermidina y espermina a putrescina en animales ["ciclo de la putrescina"]: acetiltransferasa de espermidina y oxidasa de poliaminas.

Se ha propuesto un ciclo de la putrescina para células de animales, de acuerdo con las siguientes reacciones:

- a) Síntesis de espermidina y espermina por espermidina sintetasa y por espermina sintetasa.
- b) Acetilación de espermidina y espermina a derivados N¹-acetil.
- c) Oxidación de aminas N¹-acetiladas o putrescina o espermidinas monoacetilpropionaldehído por oxidasa de poliamina.

La evidencia para tal ciclo de la putrescina es indirecto pero convincente:

1.- La administración parenteral de espermina a animales resulta en un aumento en el contenido de espermidina del hígado, y en la excreción de espermidina en la orina; igualmente la administración de espermidina resulta de un aumento de los niveles de putrescina en el hígado.

Mediciones de la actividad específica de la putrescina y espermidina después de la administración de putrescina o metionina radioactiva son consistentes con la interconversión de espermidina, espermina y putrescina.

También se conocen otros procesos biosintéticos en los cuales las poliaminas son modificadas estructuralmente y que se han postulado esas nuevas moléculas modificadas como agentes potenciales antitumorales.

2.- El contenido de citosol en el hígado contiene una acetil-CoA activa: poliamina N¹-acetiltransferasa. Esta N¹-acetiltransferasa es inducida rápidamente después del tratamiento con tioacetamida o con tetracloruro de carbono; el tratamiento con estos agentes también resulta en aumento en la cantidad de N¹-acetiespermidina en hígado y orina. Simultáneamente hay un aumento en el contenido de espermidina del hígado.

3.- La N¹-acetiespermidina es particularmente un buen sustrato para oxidasa de poliamina. Aunque estos hallazgos encontrados demuestran la existencia de estas vías, su importancia cuantitativa bajo condiciones normales fisiológicas no se ha determinado aún.

4.9.1.1. Acetilación de poliaminas en tejidos animales.

La acetilputrescina está presente en tejidos de animales normales en cantidades pequeñas y se ha involucrado en la conversión de putrescina a ácido-aminobutírico en el cerebro. Por otro lado, no se encontró acetilespermidina o acetilespermina en los tejidos de animales, con excepción de epidídimo. Se encontraron en orina cantidades significativas de N¹- y N⁸-monoacetilespermidina.

Aunque el papel fisiológico de esas poliaminas acetiladas no es muy claro, dos N-acetiltransferasas se han descrito en hígado para estas aminas. La más activa es una N¹-acetiltransferasa citoplásmica, la cual como se indicó previamente, es inducida por agentes hepatotóxicos como tetracloruro de carbono. Aún después de inducción, esta enzima se presenta en muy pocas cantidades, y una purificación de unas 112,000 veces se requirió para obtener una purificación hasta homogeneidad. La N¹-acetiltransferasa tiene un alto grado de especificidad por la posición N¹ de la espermidina y espermina. Es inactiva con histonas como sustrato y esencialmente inactiva hacia putrescina. La enzima tiene un rápido recambio con una tasa solo ligeramente mayor que la de ornitina descarboxilasa; este recambio rápido apoya fuertemente la postulación de que esta enzima tiene una función fisiológica importante [71].

Una acetiltransferasa que acetila poliaminas también se ha purificado de núcleos de hígado, pero sus características son muy diferentes de la enzima citosólica. La enzima nuclear es 3,000 veces menos activa que la enzima citosólica y en contraste a la segunda, cataliza la acetilación de histonas y putrescina, así como espermidina y espermina. La acetilación ocurre sobre la posición N¹ y N⁸ de la espermidina. Esta enzima es probablemente la misma que la N-acetiltransferasa de histonas; se han descrito dos formas. No es muy claro si las poliaminas son un sustrato fisiológico para esta enzima "in vivo".

En los años 80's se inició la especulación de los efectos que tienen las poliaminas acetiladas o la acetilación de estas moléculas sobre células cancerosas

[33].

4.9.1.2. Acetilación de poliaminas en bacterias.

Pequeñas cantidades de poliaminas acetiladas se encuentran en *Escherichia coli* que son recogidas en la fase logarítmica de crecimiento en medio mínimo. Sin embargo, grandes cantidades de poliaminas acetiladas se encuentran si hay exceso de putrescina o espermidina en las células, derivadas ya sea de fuentes exógenas o endógenas.

Una observación inexplicable es la acumulación de monoacetilespermidina y en menor grado de monoacetilputrescina aún cuando la *Escherichia coli* crece en un medio mínimo, si el cultivo es puesto a 4-6 °C. Recientemente se ha descrito la actividad de una espermidina N - acetiltransferasa en efectos de *Escherichia coli*, pero esta enzima no ha sido purificada. Esta enzima es notablemente activa a 4 °C; esto puede explicar la acumulación de espermidina acetilada a bajas temperaturas[60].

4.9.1.3. Síntesis de N¹-acetilespermidina.

Se ha descrito una síntesis no ambigua de N¹-acetilespermidina, por procedimientos sintéticos para varios derivados acetilados[73].

4.9.1.4. Oxidasa de poliamina.

La conversión de N¹-acetilespermina o N¹-acetilespermidina a espermidina o putrescina se lleva a cabo por la oxidasa de poliamina. Esta enzima ha sido purificada hasta homogeneidad en hígado de rata. Los dinucleótidos de Adenín flavina parecen ser un cofactor; el benzaldehído tiene un efecto estimulador aún no explicado sobre la enzima.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Los mejores sustratos para oxidasa de poliamina [bajo Km y alta Vmax] son N¹-acetilespermidina, N¹-acetilespermina y N¹-N¹²-diacetilespermina; la espermina y espermidina son sustratos mucho más pobres. La N⁸-acetilespermidina y N-acetilputrescina no son sustratos. La oxidasa de poliamina oxidadas dan su sustrato en un grupo amino secundario, con la formación de putrescina [de espermidina o N-acetilespermidina] o espermidina [de espermina o N¹-acetilespermina]; el otro producto es aminopropionaldehído de su derivado acetyl.

Esta reacción, en la cual la oxidación está en nitrógeno secundario, es muy similar al descrito para oxidasa de espermidina de Pseudomonas y de hojuelas de avena y para una deshidrogenasa de espermidina que se ha purificado de Serratia, sin embargo oxidan a la espermidina en el lado contrario de la amina secundaria, es decir, con la formación de 1-3 diaminopropano y Δ^1 -pirrolina. Al contrario de las enzimas de hígado y de la planta de avena, la enzima de Serratia no reacciona directamente con oxígeno molecular, y contiene tanto HEM como FAD [9,91].

4.9.2. Otras oxidasas de amina.

Las poliaminas y sus derivados acetilados son también oxidados en los grupos amino terminal por varias oxidasas de amina, aisladas de diferentes fuentes; cada una de estas enzimas parecen tener diferentes sustratos e inhibidores específicos. Una enzima purificada de suero humano de embarazadas mostró oxidar la espermidina, N¹-acetilespermidina, N⁸-acetilespermidina, y espermina, así como histamina y diaminas, difiriendo en la especificidad de la oxidasas de amina del plasma de carnero[90].

La oxidación del grupo amino terminal de espermidina y espermina ocurre "in vivo". Después de la administración intraperitoneal de espermidina a ratones, el hígado contiene carboxietilputrescina [putreanina]; después de la administración de espermina, se encontró carboxietilespermidina. Estos componentes se forman presumiblemente por una oxidación posterior al aldehído formado por oxidación de la espermidina, por una enzima similar a la oxidasas de espermina purificada del suero de carnero. La carboxietilputrescina [putreanina] es de particular interés por su alta concentración en el cerebro. Después de la administración de espermidina, tejidos y orina también contienen una N-[3-aminopropil]-pirrolidina-2, el cual puede ser hidrolizado a isoputreanina [N-carboxipropilidiaminopropano]. El derivado acetilado de este compuesto se encuentra también después de

la administraci3n de N¹-acetilespermidina. La excreci3n de urinaria tanto de putreanina y de un derivado de la isoputreanina es marcadamente disminuïda por la administraci3n de aminoguanidina, un inhibidor de las enzimas similares a la oxidasa de amina[49,77].

4.9.3. Formaci3n de hipusina.

Cuando los linfocitos humanos se tratan con un mit3geno y crecen en presencia de putrescina o espermidina marcadas, un peque1o porcentaje del marcado es especïficamente incorporado en una proteïna simple que recientemente ha mostrado ser el factor de iniciaci3n para eucariotes eIF-4D. Despu3s de la hidr3lisis el componente radioactivo fu3 identificado como hipusina N⁸-[4-amino-2-hidroxi-butil]lisina un compuesto que ha sido descrito previamente como un amino-3cido libre en cerebro de bovino. Un mol de hipusina se encontr3 por mol de eIF-4D. La mol3cula 4-amino-2-hidroxi-butil se deriv3 de espermidina por una modificaci3n post-traducci3n del eIF-4D en dos pasos[34,38]:

P3ptido-unido a lisina + espermidina ---> p3ptido-unido
a deoxipusina.

P3ptido-unido a lisina + espermidina ---> p3ptido-unido
a hipusina.

El papel fisiológico de la hipusina es aún desconocido, sin embargo, su aumento en concentración durante el crecimiento celular y su presencia en una proteína que es factor de iniciación, sugiere que puede ser importante en la regulación de reacciones de la biosíntesis proteica.

4.9.4. Otras vías metabólicas.

4.9.4.1. Transglutaminasa.

Una variedad de aminas primarias, incluyendo diaminas, espermidina y espermina, son sustratos para transglutaminasa de cerdos de guinea y pueden formar ligaduras cruzadas entre cadenas peptídicas. Se ha sugerido que las poliaminas pueden ser sustratos de transglutaminasa "in vivo", debido a que núcleos y nucleolos aislados de hígado de vaca contienen putrescina ácido-precipitable, espermidina y conjugado de espermina.

La putrescina, espermidina y espermina se han encontrado unidas covalentemente a polipéptidos en una forma ácido-precipitables en líquido amniótico humano, sangre y orina. La naturaleza de su unión no se ha establecido.

4.9.4.2. γ -glutamil ciclotransferasa.

Se han descrito varios derivados γ -glutamil de putrescina, espermidina y espermina. Una enzima γ -glutamil [amino ciclotransferasa], que cataliza la conversi3n de estos a aminas libres y 5-oxo-L-prolina se ha purificado del riñ3n de conejo.

4.10. Otros derivados y an3logos de las poliaminas.

En la mayori3 de los tejidos y microorganismos, las principales poliaminas presentes son putrescina, espermidina y espermina y sus derivados. Pequeñas cantidades de cadaverina se encuentran a veces, especialmente en c3lulas deficientes de poliaminas. En algunos materiales biol3gicos, sin embargo, otros an3logos son encontrados; estos incluyen 1,3-diaminopropano, norespermidina, sym-homoespermidina, termina, termoespermina, caldopentamina y homocaldopentamina as3 como canavalmina [27].

Otros derivados de poliaminas se han descrito, estos incluyen derivados de glutationil espermidina, γ -glutamil-putrescina, hidroxiputrescina, varias edeinas, guanidoespermidina, agrobactina, parabactina, bleomicina, cumaroilagmatina y espergualina. Muchos derivados poco usuales de aminas, incluyendo aminas metiladas y alcaloides que contienen

aminas, se han encontrado en plantas.

4.10.1. Estudios fisicoquímicos.

Hay numerosos estudios sobre las constantes de disociación para las poliaminas, ampliando los primeros estudios con una variedad de técnicas incluyendo titulación potenciométrica con ^{15}N -NMR y ^{13}C -NMR. Los valores de pK son: 11.50, 10.95, 9.79, y 8.90 para espermina y 11.56, 10.80, y 9.25 para espermidina [obtenido por titulación de pH]_[7].

5.0 POLIAMINAS Y CANCER.

La asociación de altos niveles de ornitina descarboxilasa y poliaminas con rápido crecimiento ha conducido a muchos estudios sobre la relación de las aminas con el cáncer.

Estos estudios se han concentrado sobre el aumento del contenido de poliaminas de células cancerosas, el aumento en la excreción de poliaminas en orina y terapia con inhibidores de la biosíntesis de poliaminas, como el difluormetilornitina o metilglioxal bis [guanilhidrazona].

Particular énfasis se ha puesto sobre el uso de estos cambios de poliaminas en orina para el diagnóstico de neoplasias, o para seguir los efectos de la quimioterapia en cáncer [12,25,58,59].

6.- CONCLUSIONES.

I.- La búsqueda de información documental con respecto a poliaminas, nos permite describirlas como el grupo de compuestos orgánicos con más de un grupo funcional amino [cargado positivamente], y de las cuales las más importantes son : putrescina, espermidina y espermina; encontrándose en microorganismos y células vegetales y animales, con un papel biológico fundamental.

Se sabe que el DNA de las células se asocia a las poliaminas, tomando en cuenta las cargas positivas de las aminos en solución, por lo que se "acomplejan", evento denominado condensación coordinada observable al microscopio electrónico [como estructuras de forma variable, esferas, bastones, etc.].

Esta asociación repercute en reducir la capacidad de duplicarse el DNA. Sin embargo, por otra parte, se establece la posibilidad de que las poliaminas actúen incrementando la transcripción y traducción genética; por lo que la biosíntesis de RNA y proteínas se ve incrementada bajo su influencia.

II.- Se ha establecido que el papel de las poliaminas con respecto a los mecanismos de la expresión genética, implica una intervención como moduladores de estos procesos.

7.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- A. Demetriou, Achilles., S.Cohn, Murray., White, Tabor, Celia; and Tabor, Herbert.: Identification of pyruvate in S-adenosylmethionine decarboxylase from rat liver Journal of Biological Chemistry. 253[5]:1684-1686, 1978.
- 2.- A. Nash, Howard.: Integrative recombination of Bacteriophage Lambda DNA in vitro [genetic recombination/int gene product/xis gene product]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72[3]:1072-1076, 1975.
- 3.- A. Kyriakidis, Dimitri., S. Heller, John., and S. Canellakis, E.: Modulation of ornithine decarboxylase activity in Escherichia coli by positive and negative effectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75[10]:4699-4703, 1978.
- 4.- A. Recsei, Paul., M. More, William., and E. Snell, Esmond; Pyrovoyl-dependent histidine decarboxylases from Clostridium perfringens and Lactobacillus buchneri. Comparative structures and properties. Journal of Biological Chemistry. 258[1]:439-444, 1983.
- 5.- A. Recsei, Paul., K. Huynh, Quang., and E. Snell, Esmond.: Conversion of prohistidine decarboxylase to histidine decarboxylase: Peptide chain cleavage by nonhydrolytic serinolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80[4]:973-977, 1983.
- 6.- A. Vanbogelen, Ruth., Vaughn, Vicki., and C. Neidhardt, Frederick.: Gene for heat-inducible lysyl-tRNA synthetase [lys U] maps near cad A in Escherichia coli. Journal of Bacteriology 153[2]:1066-1068, 1983.

- 7.- Aikens, D., Brunce, S., Onasch, F., Parker, R. 3rd, Hurwitz, C., Clemens, S.: The interactions between nucleic acids and polyamines. II. Protonation constants and ¹³C-NMR chemical shift assignments of spermidine, spermine, and homologs. *Biophys. Chem.* 17[1]:67-74, 1983.
- 8.- Altman, Arie., Friedman, Ra'anan., and Levin, Nitsa: Argine and ornithine decarboxylases, the polyamine biosynthetic enzymes of mung bean seedlings. *Plant. Physiol.* 69[4]: 867-879, 1982.
- 9.- Bachrach, Uriel: Spermidine oxidase from *Serratia marcescens*. *Journal of Biological Chemistry.* 237[11]: 3443-3448, 1962.
- 10.- Bartholeyns, Jacques: Subcellular distribution of ornithine decarboxylase in rat liver and accessibility of the enzyme to α -difluoromethylornithine, and irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase. *Life Sciences* 32[12]:1305-1312, 1983.
- 11.- Bey, Philippe., Gerhart, F., Van, Dorsselaer, V., and Danzin, C.: α -[fluoromethyl]dehydroornithine and α -[fluoromethyl]dehydroputrescine analogues as irreversible inhibitors of ornithine decarboxylase. *Journal of Medical Chemistry.* 26[11]:1551-1556, 1983.
- 12.- Bregman, M. D., and Meyskens, F. L.: Difluoromethylornithine enhances inhibition of melanoma cell growth in soft agar by dexamethasone clone A interferon and retinoic acid. *Int. J. Cancer.* 37[1]:101-109, 1986.
- 13.- C. Mc. Conlogue, Lisa., J. Marton, Laurence., and Coffino, Philip: Growth regulatory effects of cyclic AMP and polyamine depletion are dissociable in cultured mouse lymphoma cells. *The Journal of Cell Biology.* 96[3]:762-767, 1983.

- 14.-Carragher, Charles E. Jr., López, Isabel: Thermal degradation and elemental analysis intercorrelation for platinum II polyamines. Vol. 54. 618-622, 1986.

- 15.-Carragher, Charles E. Jr., López, Isabel; Giron David: Synthesis structural and biological characterization of the polymeria platinol derivate of methotrexate for the treatment of juvenile diabetes. Vol. 53. 644-648, 1985.

- 16.-Christian Löser, Md., Ulrich R. Fölsch, Md., Christop Paprotny, Md.: Evaluation of polyamine concentrations in the colon tissue, serum and urine of 50 patients with colorectal cancer. Vol. 65. 958-966, 1990.

- 17.-Cunningham-Rundles Susanna and K. Maas Werner: Insolation characterization, and mapping of escherichia coli mutants blocked in the synthesis of ornithine decarboxilase. Journal of Facteriology 124[2]:791-799, 1975.

- 18.-D. Kuehn, Glenn., Affolter, Hans-Urs., J. Atmar, Valerie., Seebek Thomas., Gubler, Veli., and Braun. Richard: Polyamine-mediated phosphorylation of a nucleolar protein from Physarum polycephalum that stimulates rRNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76[6]:2541-2545, 1979.

- 19.-D. Luk, Gordon., J. Sharkis, Saul., D. Abeloff, Martin., P. Mc. Cann Peter., Sjoerdsma, Albert., and B. Baylin, Stephen.: Polyamine biosynthesis is required for the maintenance of peripheral blood cell elements in the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80[16]:5090-5093, 1983.

- 20.-D. Markham, George., White, Tabor, Celia., and Tabor, Herbert : S-adenosylmethionine decarboxylase of Escherichia coli. Studies on the covalently linked pyruvate required for activity. Journal of Biological Chemistry. 257[20]:12063-12068, 1982.

- 21.-E.I.Pajunen,Antti.,V.Isomaa,Veli.,A.Jâne,Olli,and Wayne, Bardin,C.: Androgenic regulation of ornithine decarboxylase activity in mouse kidney and its relationship to changes in cytosol and nuclear androgen receptor concentrations.Journal of Biological Chemistry. 257 [14] 8190-8198,1982.
- 22.-E.Pegg,Anthony.,Pôsô,Hannu.,Shuttleworth,Kay.,and A. Bennett,Richard: Effect of inhibition of polyamine synthesis on the content of decarboxylated S-adenosyl-methionine.Biochemical Journal.202[1]:519-526,1982.
- 23.-E.Pegg,Anthony.,: Inhibition of mammalian S-adenosyl-methionine decarboxylase activity by 1,1' -[(methylethanediyilidene)-dinitrilo] bis (3-aminoguanidine).Journal of Biological Chemistry.253[2]:539-542,1978.
- 24.-E.Seyfried,Christine.,and R.Morris,David: Relationship between inhibition of polyamine biosynthesis and DNA replication in activated lymphocytes. Cancer Research. 39[12]:4861-4867,1979.
- 25.-Falzon,M.,McMahon,J.B.,Gazdar,A.F.,and Schuller,H.M. : Preferential metabolism of N-nitrosodiethylamine by two cell lines derived from human pulmonary adenocarcinomas. Carcinogenesis.7[1]:17-22,1986.
- 26.-Freddice,J.,J.Dehlinger,Peter., and T. Schimke, Robert : Studies on the correlation between size and relative degradation rate of soluble proteins.Journal of Biological Chemistry.248[12]:4220-4228,1973.
- 27.-Fujihara,Shinsuke.,Nakashima,Toshikatsu.,and Kuroguchi, Yutaka: Occurrence of a new polyamine,canavalmine,in the sword bean canavalia gladiata. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107[1]:403-410,1982.

- 28.-Giannakouros,Thomas.,Nikolakaki,Helen.: Concentration-dependent effects of natural polyamines on peptide chain initiation and elongation in a cell-free system of protein synthesis.Molecular and cellular Biochemistry. Vol.59.9-19,1990.
- 29.-Gordon, D. Luk.: Polyamines in intestinal growth. Biochemical Society Transaction. Vol.18.1090-1091,1990.
- 30.-H.Bowman,William.,White,Tabor,Celia.,and Tabor,Herbert.: Spermidine biosynthesis. Purification and properties of propylamine transferase from Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry. 248[7]:2480-2484,1973.
- 31.-Haddock,Russell,Diane: Posttranslational modification of ornithine decarboxylase by its product putrescine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 99[4]:1167-1172,1981.
- 32.-Haddock,Russell,Diane: Microinjection of purified ornithine decarboxylase into Xenopus oocytes selectively stimulates ribosomal RNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80[5]:1318-1321,1983.
- 33.-Harterter,M.,Wallace and Colemans,Catherine.: Changes in polyamine acetylation in human cancer cells. Vol.18:1091-1093,1990.
- 34.-Hee,Park,Myung.,L.Cooper,Herbert.,and E.Folk,J.: Identification of hypusine,an unusual amino acid,in a protein from human lymphocytes and spermidine as its biosynthetic precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78[5]:2879-2873,1981.
- 35.-Hessels,Jan.,Ferwerda,Harry.: Inhibition of polyamine oxidase in rats improves the sensitivity of urinary polyamines as markers for cell death. Biochemical Journal. Vol.266:843-851,1990.

- 36.-Hilger, Françoise., and K.Mortimer, Robert: Genetic mapping of arg 1 and arg 8 in *Saccharomyces cerevisiae* by trisomic analysis combined with interallelic complementation. *Journal of Bacteriology*. 141[1]:270-274, 1980.
- 37.-Hirashima, A., Harigai, H., and Watanabe, I.: Enhancing effect of magnesium ion on cell-free synthesis of read-through protein of Bacteriophage QB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88[3]:1046-1051, 1979.
- 38.-Imaoka, Nobuo., and Nakajima, Teruo.: Hypusine, N⁶-(4-amino-2-hydroxyethyl)-2,6-diaminohexanoic acid, in tissue proteins of mammals. *Biochem. Biophys. Acta.* 320[1]:97-103, 1973.
- 39.-J. Atmar, Valerie., and D. Kuehn, Glenn : Phosphorylation of ornithine decarboxylase by a polyamine-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78[9]:5518-5522, 1981.
- 40.-J. Bacchi, C., C.Nathan, H., H. Hutner, S.,: Polyamine metabolism: A potential therapeutic target in Trypanosomes. *Science*. 210[4467]:332-334, 1980.
- 41.-J. Quigley, Gary., M.Teeter, Martha., and Rich, Alexander : Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75[1]:64-68, 1978.
- 42.-J.Paulus, Thomas., Kiyono, Paul., and H.Davis, Rowland : Polyamine-deficient *Necrospora crassa* mutants and synthesis of cadaverine. *Journal of Bacteriology*. 152[1]:291-297, 1982.
- 43.-J.Roon, Robert., and A.Barker, H.: Fermentation of agmatine in *Streptococcus faecalis*: occurrence of putrescine

- transcarbamoylase. *Journal of Bacteriology*. 109[1]:
44-50,1972.
- 44.-Jänne,J.,Pöösö, H., and Raina, A.: Polyamines in rapid
growth and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. 473[2]:241-
293,1978.
- 45.-K. Chatteras,Dhruba., C.Gesule, Leonard, and A. Schell-
man,John. : DNA condensation with polyamines II
electron. *Journal Mol. Biol*. 121:327-337,1978.
- 46.-K. Haddox,Mari., and Haddock,Russell,Diane : Increased
nuclear conjugated polyamines and transglutaminase
during liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
78[3]:1712-1716,1981.
- 47.-K.Kontula,Kimmo.,K.Torkkeli,Tuula., Wayne,Bardine,C.,and
A.Jänre,Olli.,: Androgen induction of ornithine decarbo-
xylase mRNA in mouse kidney as studied by complementary
DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 81[3]:731-735,1984.
- 48.-K. Tyagy, Anil., Taber,Herbert.,and White,Tabor,Celia :
Inactivation of yeast ornithine decarboxylase by poly-
amines "in vivo" does not result from the incorporation
of polyamines into enzyme protein. *Biochem. Biophys.*
Res. Commun. 109[2]:533-540,1982.
- 49.-Kakimoto,Yasuo., Nakajima,Teruo., Kumon,Akira.,Matsuoka,
Yukio., Imaoka,Nobuo., and Sano,Isamu.: Putreanine,
N-(4-aminobutyl)-3-amino propanic acid. An amino acid
occurring uniquely in the mammalian central nevoy
system. *Journal of Biological Chemistry*.244[21]:6003-
6007,1967.
- 50.-Kameji, Takaaki., and Hayashi, Shin-Ichi.: Affinity
labeling of purified ornithine decarboxylase by α -diflu-

- omethylornithine. *Biochim. Biophys. Acta.* 705[3]: 405-407,1982.
- 51.-L. Peebles, Caraig., Gegenheimer, Peter., and Abelson, John.: Precise excision of intervening sequences from precursor tRNAs by a membrane-associated yeast endonuclease. *Cell.* 32[2]:525-536,1983.
- 52.-L. Rosano, Carmen., C. Bunce, Stanley., and Hurwitz, Charles.: Localization of polyamine enhancement of protein synthesis to subcellular components of *Escherichia coli* and *Pseudomonas* sp. strain kim. *Journal of Bacteriology.* 153[1]:326-334,1983.
- 53.-Lövgrén, Timo, Nils, Erik., Peterson, Auli., and B. Löffler, Robert.: The role of magnesium and spermidine in the synthesis of isoleucyl-tRNA. *Journal of Biological Chemistry.* 253[19]:6702-6710,1978.
- 54.-Lynn, Fink, Mary., II, Chung, Soo., and E. Folk, J.: γ -glutamylamine cyclotransferase: Specificity toward ϵ -(L- γ -glutamyl)-L-lysine and related compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77[8]:4564-4568,1980.
- 55.-M. Applebaum, Deborah., C. Dunlap, Jay., and R. Morris, Davis: Comparison of the biosynthetic and biodegradative ornithine decarboxylases of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 16[8]:1580-1584,1977.
- 56.-M. Guirard, Beverly., and E. Snell, Esmond.: Purification and properties of ornithine decarboxylase from *Lactobacillus* sp. 30a. *Journal of Biological Chemistry* 255[12]:5960-5964,1980.
- 57.-Mach, M., Ebert, P., Popp, R. and Ogilvie, A.: Compartmentalization of polyamines in mammalian cells. *Biochem.*

Biophys. Res. Commun. 104[4]:1327-1334,1982.

- 58.-Maduagwu, E.N., and Uhegbu, F.D.: N-nitrosamines and Nigerian habitual drinks, and cancer. Carcinogenesis. 7[1]:149-153,1986.
- 59.-Manni, Andrea., Badger, Betty. : Role of polyamines in the growth of hormone-responsive and resistant human breast cancer cells in nude mice. Cancer Letters. Vol. 66: 1-9, 1992.
- 60.-Matsui, Isac., Kamei, Masaharu., Otani, Shuzo., Morisawa, Seiji., and E. Pegg, Anthony: Occurrence and induction of spermidine-N'-acetyltransferase in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 106[4]:1155-1160,1982.
- 61.-Mc.Conlogue, Lisa., and Coffino, Philip: A mouse lymphoma cell mutant whose major protein product is ornithine decarboxylase. Journal of Biological Chemistry. 258[20]: 12083-12086,1983.
- 62.-Morgan M.L. David. : Polyamines and cellular regulation: Perspectives. Biochemical Society Transactions. Vol.18. 1080-1083,1990.
- 63.-Menligaziyeb, Ye. Zh., Yergozhin, Ye.: Anionic exchange membranes based on glycidyl ethers of some dihydroxybenzenes. Vol. 28[5]:1001-1005,1986.
- 64.-Oka, Takami., W.Perry, John.: Arginase affects lactogenesis through its influence on the biosynthesis of spermidine. Nature. 250[468]:660-661,1974.
- 65.-Olle, Hebi., Ingvar, Holm and Lo. Persson.: Polyamine-mediated control of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase expression in mammalian cells.

Biochemical Society Transaction. Vol.18:1084-1087,1990.

66.-Ottenbrite, Raphael, M., Chen, Herbert.: Synthesis and Characterization of 3,4-Dimethylenepyrrolidine polymers. Vol. 27[2]:13-14.1986.

67.-Pôsô, Hannu., and E.Pegg,Anthony.: Measurement of the amount of ornithine decarboxylase in *Sacharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* by using α -[5- 14 C] difluoromethylornithine. *Biochim. Biophys. Acta* 747[3]: 209-214,1983.

68.-R.Allen,Robert., and P. Klinman,Judith.: Stereochemistry and kinetic isotope effects in the decarboxylation of S-adencylmethionine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*. 256[7]:3233-3239,1981.

69.-R.A. Mitchell,John., and Michael,Wilson,J.: Polyamine-stimulated alteration of the ornithine decarboxylase molecule in *Physarum polycephalum*. *Biochemical Journal* 214[2]:345-351,1983.

70.-R. Barnett, Glenn., and N. Kazarinoff, Michael. : Purification and properties of ornithine decarboxylase from *Physarum polycephalum*. *Journal of Biological Chemistry*. 259[1]:179-183,1984.

71.-R.Libby,Paul.: Calf liver nuclear N-acetyltransferases purification and properties of two enzymes with both spermidine acetyltransferase and histone acetyltransferase activities. *Journal of Biological Chemistry*. 253[1]:233-237,1978.

72.-R.Fozard,John.,Part,Marie-Louise.,J.Prakash,Nellikunja., Grove,Jeffrey.,J.Schechter,Paul.,Sjoerdsma,Albert.,Koch-Weser,Jan.: L-ornithine decarboxylase: An essential role

- in early mammalian embryogenesis. *Science*. 208[4443]: 505-508,1980.
- 73.-Raina, A., Jänne, J., eds. : Polyamines as cellular regulators. *Med. Biol.* 59[5-6]:269-461,1981.
- 74.-S. Cohn,Murray., White,Tabor,Celia and Tabor, Herbert : Regulatory mutations affecting ornithine decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 142[3]:791-799,1980.
- 75.-S.Coher,Seymour.,and L. Greenberg,Michael.: Spermidine, an intrinsic component of turnip yellow mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78[9]:5470-5474,1981.
- 76.-S. Srivenugopal, Kalkunte., and Fadhakantha, Adiga, P. : Enzymic conversion of agmatine to putrescine in *Lathyrus sativus* seedlings. *Journal of Biological Chemistry*. 256[18]:9532-9541,1981.
- 77.-Seiler,Nikolaus.,Knödgen,Bernd., and W.Gittos,Maurice. : On the formation of amino acids deriving from spermidine and spermine. *Biochemical Journal*. 200[1]:123-132,1981.
- 78.-Seiler,Niklaus., Sarhan,Shakir.: Endogenous and Exogenous Polyamines in support of tumor growth. *Cancer Research*. Vol. 50:5077-5083,1990.
- 79.-Seppänen, P., Alhonen-Hongisto, L., and Jänne, J. : Polyamine deprivation-induced enhanced uptake of methylglyoxal bis (guanylhydrazone) by tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 674[2]:169-177,1981.
- 80.-Siegmann. Deborah, W., Carraher, Charles. E.: Relative toxicity of poly-(-cis-dichloromethotrexate Platinum II) on normal and transformed cells. Vol. 56:79-83,1987.

- 81.-Steglich, Carolyn., and E.Scheffler,Immo.: An ornithine decarboxylase-deficient mutant of chinese hamster ovary cells. The Journal Of Biological Chemistry. 257[8]: 4603-4609,1982.
- 82.-Tabor, Herbert., and White, Tabor, Celia. : Polyamine requirement for efficient translation of amber codons "in vivo". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79[12]:7087-7091,1982.
- 83.-Tabor,Herbert.,White,Tabor,Celia.,S.Cohn,Murray.,and W. Hafner,Edmund.: Streptomycin resistance(rpsL) produces an absolute requirement for polyamines for growth of an Escherichia coli strain unable to synthesize putrescine and spermidine [Δ (spe A-spe B) Δ spe C]. Journal of Bacteriology. 147[2]:702-704,1981.
- 84.-Tabor, Herbert., W.Hafner,Edmund.,and White, Tabor, Construction of an Escherichia coli strain unable to synthesize putrescine, spermidine, or cadaverine: Characterization of two genes controlling lysine decarboxylase. Journal of Bacteriology. 144[3]: 952-956,1980.
- 85.-Tang, Kuo-Chang.,Mariuzza, Roy., and K.Coward,James. : Synthesis and evaluation of some stable multisubstrate adducts as specific inhibitors of spermidine synthase. Journal of Medical Chemistry. 24[9]:1277-1284,1981.
- 86.-Urithami,Mashiro.,Nakano,Kyoko.,Hokiyunko.: Polyamino acids that inhibit the interaction of yeast translational elongation factor -3(EF -3) with ribosomes. Journal Biochem. Vol. 115:820-824,1994.
- 87.-Usawa,Taketoshi., Yamagishi,Akihiko.: Effects of unusual polyamines on phenylalanyl-tRNA formation. J. Biochem.

Vol. 115:830-832,1994.

- 88.-W. White, Michael., Degnin, Cathy.: Specific regulation by endogenous polyamines of translational initiation of S-adenosylmethionine decarboxylase m-RNA in swiss 3T3 fibroblast. *Biochem J.* Vol. 268:657-660,1990.
- 89.-W. Hafner, Edmund., White, Tabor, Celia., and Tabor, Herbert.: Mutants of *Escherichia coli* that do not contain 1,4-diaminobutane (putrescine) or spermidine. *Journal of Biological Chemistry.* 254[24]:12419-12426,1979.
- 90.-White, Tabor, Celia., Tabor, Herbert., and M. Roshental, Sanford.: Purification of amine oxidase from beef plasma. *Journal of Biological Chemistry.* 208[2]:645-661, 1954.
- 91.-White, Tabor, Celia., and Deal, Kellogg, Patricia. : Identification of flavin adenine dinucleotide and heme in a homogeneous spermidine dehydrogenase from *Serratia marcescens*. *Journal of Biological Chemistry.* 245[20]: 5424-5433,1970.
- 92.-Widom, Jonathan., and L. Baldwin, Robert.: Cation-Induced toroidal condensation of DNA. Studies with $\text{Co}^{3+}(\text{NH}_3)_6$. *Journal of Molecular Biology.* 144[4]:431-453, 1980.
- 93.-Yamamoto, Shigeo., Okojo, Noriyuki.: Structures of two Polyamine-containing catecholate Siderophores from *Vibrio fluvialis*. *J. Biochem.* Vol. 113:538-544,1993.