

19 300627  
2ej



# UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA

INCORPORADA A LA UNAM

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ARGINASA EN PANCREAS HUMANO

**TESIS PROFESIONAL**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
PRESENTA  
MARIA CELIA VILLAZON GUTIERREZ

**DIRECTOR DE TESIS:**  
M. en C. José Domingo Méndez Francisco.

México, D.F.

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# I N D I C E

	Página.
RESUMEN .....	I
OBJETIVO .....	II
INTRODUCCION .....	1
GENERALIDADES .....	3
Arginasa .....	3
Ciclo de la urea .....	3
Poliaminas y metabolismo de carbohidratos .....	7
Páncreas .....	10
Función exócrina .....	10
Función endócrina .....	10
Insulina .....	12
Efectos .....	13
Acción Biológica .....	13
Diabetes .....	14
Factores que la producen .....	14
Sintomatología .....	14
Tratamiento .....	18
Efectos del suministro de Arginina .....	19
MATERIAL Y METODOS .....	28
Material Biológico .....	28
Material Químico .....	28
Método .....	28
RESULTADOS .....	30
DISCUSION DE RESULTADOS .....	41
CONCLUSIONES .....	44
APENDICE .....	45
BIBLIOGRAFIA .....	52

LUGAR DONDE SE DESARROLLO LA TESIS:

Lab. de Bioquímica Experimental  
Unidad de Investigación Biomedica  
Centro Médico Nacional. IMSS

Bajo la dirección del

M. en C. José Domingo Méndez Francisco.

## R E S U M E N

La arginasa es la enzima que cataliza la reacción de hidrólisis de la L - arginina para formar L - ornitina y urea. Su principal función y mejor conocida es la que realiza dentro del ciclo de la urea. Esta enzima ha sido ampliamente estudiada en el hígado, pero también existe en tejidos extrahepáticos y su actividad ha sido asociada con la regulación de múltiples procesos, ya que la ornitina producto de esta reacción participa en diversas vías metabólicas. Esta enzima ha sido descrita en diferentes tejidos y fluidos humanos en condiciones de salud y enfermedad. En este trabajo se determinó la actividad de la arginasa en diferentes fracciones ( cabeza, cuerpo y cola ) del páncreas humano normal, diabético y con daño provocado por alcoholismo. Demostrándose que la actividad de la arginasa está presente en el páncreas humano, pero que en condiciones patológicas la síntesis de esta enzima puede estar afectada ya que su actividad es menor en el tejido dañado.

**OBJETIVO:**

Determinar la actividad de arginasa en diferentes regiones de páncreas (cabeza, cuerpo y cola) y correlacionar esta actividad con la concentración de ácido desoxirribonucleico, proteínas y el contenido de materia orgánica total.

## INTRODUCCION:

Las poliaminas son una serie de pequeñas moléculas de cadena lineal de naturaleza no proteínica, son de bajo peso molecular y se encuentran ampliamente distribuidas en los sistemas vivientes, lo que quizá constituye un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de la función celular.

La putrescina, espermidina y espermina constituyen el grupo de poliaminas que ha sido más estudiado, aunque existen otras aminas que han sido destacadas en varios sistemas biológicos. (1) Se ha demostrado en muchos sistemas celulares que las poliaminas son necesarias para el crecimiento óptimo, en la mayoría de las células esta necesidad es absoluta.

Las poliaminas además de encontrarse en forma de bases alifáticas libres, pueden existir conjugadas con azúcares, esteroides, fosfolípidos y péptidos, así como unidades subestructurales dentro de numerosas familias de alcaloides.

Las concentraciones relativas de estas tres poliaminas varían notablemente en células diferentes. Los procariontes tienen más altas concentraciones de putrescina que de espermidina y carecen de espermina. Por el contrario los eucariontes tienen menores concentraciones de putrescina y contienen más espermidina y espermina. (2)

La putrescina es el precursor de la síntesis de la espermidina y espermina; en las células animales esta diamina se obtiene de la ornitina. Por lo tanto, la ruta que conduce a la formación de putrescina en los mamíferos es a través de la enzima ornitina descarboxilasa ( ODC ) ( E. C. 4. 1. 1. 17 ). Los microorganismos y los vegetales poseen vías alternas para la biosíntesis de poliaminas. (1, 3)

La ornitina disponible para la biosíntesis de poliaminas proviene del plasma, además de que puede formarse dentro de las células por la acción de arginasa ( E. C. 3. 5. 3. 1. ). Posiblemente esta enzima se encuentre presente en tejidos extrahepáticos para facilitar la disponibilidad de la ornitina utilizada en la biosíntesis de poliaminas. Debido a esto se cree que la arginasa regula la etapa inicial de dicha biosíntesis.

Cuando aumenta la síntesis de poliaminas se ha visto que también aumenta la actividad de arginasa lo que asegura el suministro de ornitina.

Entre muchas de las acciones de las poliaminas, estas pueden regular la síntesis de DNA polimerasa, DNA dependiente, estimular la transcripción de RNA y por lo tanto favorecer la síntesis de proteínas. Además de que protegen a los ácidos nucleicos estabilizando la estructura secundaria contra la desnaturalización térmica y la degradación enzimática.

En los mamíferos, incluyendo al hombre, la espermidina y la espermina están presentes en la mayor parte de los tejidos en una concentración aproximada de 1 mM mientras que la putrescina esta

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

Campbell ( 4 ) ha hecho una descripción amplia sobre la participación de la poliaminas en relación a eventos normales, desórdenes en el crecimiento, enfermedades genéticas y en otras alteraciones relacionadas con la fisiología renal.



## GENERALIDADES:

### ARGINASA:

La arginasa ( L - arginina amidinohidrolasa, E. C. 3. 5. 3. 1. ) fue descubierta y descrita por Kosel y Dakin en 1904 ( 5 ). Esta enzima se detectó por primera vez en el hígado de los mamíferos como la enzima terminal del ciclo de la urea, mecanismo postulado por H. A. Krebs en 1932. ( 5 )

Además de la función hepática, la actividad de la arginasa esta asociada con la regulación de diversos procesos celulares. Esta enzima se encuentra presente en diferentes tejidos de mamíferos y en otros sistemas vivientes, lo que constituye un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de procesos básicos de la función celular.

En el hombre se ha demostrado actividad de arginasa en el riñón ( 6 ), placenta ( 7 , 8 ), corazón ( 9 ), sangre ( 10 ), eritrocitos ( 11 - 18 ), linfocitos y granulocitos leucémicos ( 19 ), en líneas de células tumorales en cultivo ( 20 ), en suero, tanto en personas sanas ( 21, 22 ) como en pacientes con enfermedades del hígado ( 23, 24 ) y otros padecimientos diversos ( 25 - 28 ), etc.

La arginasa es la enzima que cataliza la hidrólisis de la L - arginina a L - ornitina y urea. Su función principal y mejor conocida es la que realiza dentro del ciclo de la urea.

La naturaleza química de la enzima no se conoce totalmente; su actividad se aumenta o se disminuye en presencia de algunos cationes (cofactores), principalmente con  $Mn^{++}$ . El rango de pH óptimo para la arginasa está entre 9.3 y 10.0. Es una enzima que hidroliza uniones C - N no peptídicas y que tiene afinidad por el sustrato L - arginina y no así por los isómeros D - arginina y L - homocarginina.

La arginasa tiene una estructura oligomérica, siendo un tetramero que consiste en cuatro monómeros, cada uno de los cuales tiene un peso molecular de 30,000 - 40, 000 daltones y un ion  $Mn^{++}$  intimamente ligado.

La arginasa mejor caracterizada es la de hígado de rata la cual tiene un peso molecular de 120,000 Daltones ( 29, 30 ) y un pH óptimo alrededor de 9.5 ( 31 ). La enzima de hígado humano tiene un peso molecular de 107, 000 y su pH óptimo es 9.3 ( 13 ).

### CICLO DE LA UREA:

La formación de urea, que tiene lugar en el hígado de los organismos ureotelicos (los que excretan el nitrógeno amínico en forma de urea) es catalizada por el mecanismo cíclico denominado ciclo de la urea ( FIGURA 1 ). La ecuación global de este ciclo es:

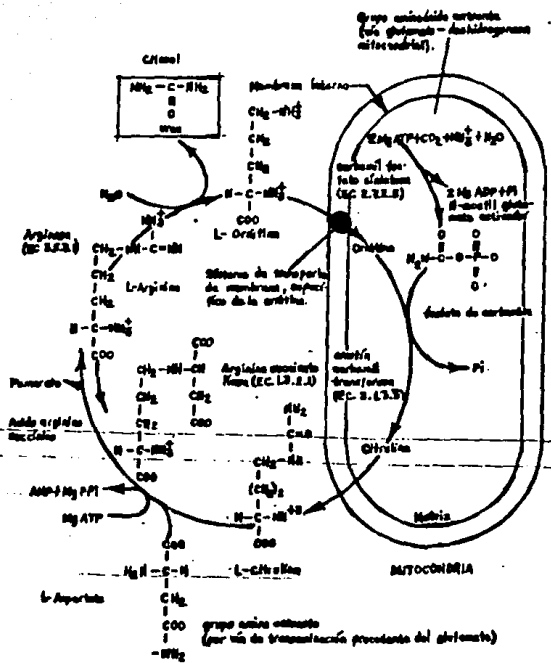


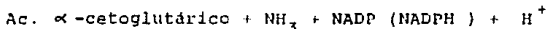
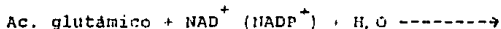
FIGURA 1 : Ciclo de la urea que muestra las etapas citoplásmica y mitocondrial ( 5 ).



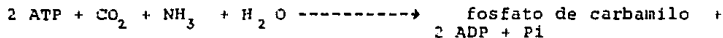
A la secuencia de reacciones del ciclo de la urea se incorporan dos grupos amino, originalmente derivados de los  $\alpha$ -aminoácidos y una molécula de dióxido de carbono, mediante este proceso cíclico que requiere ATP, se da lugar a la formación de una molécula de urea, compuesto neutro y no tóxico que es transportado por la sangre a los riñones y excretado por la orina.

El ciclo de la urea consiste de cinco pasos regulados enzimáticamente.

1. - El primer grupo amino que entra en el ciclo de la urea surge en forma de amoníaco libre como consecuencia de la desaminación oxidativa del glutamato en las mitocondrias hepáticas:



El amoníaco libre es utilizado entonces junto con el dióxido de carbono para formar fosfato de carbamilo, en una compleja reacción catalizada por la carbamil fosfato sintetasa (amoníaco), presente en la matriz mitocondrial:



Se necesitan dos moléculas de ATP para formar cada molécula de fosfato de carbamilo que interviene en esta reacción, la cual es esencialmente irreversible. Esta reacción, que requiere al menos de dos etapas, necesita de N - acetilglutamato, un activador alostérico.

La formación de fosfato de carbamilo en las mitocondrias, por esta ruta, está especializada en la síntesis de urea. En el citosol de algunos tejidos, así como en bacterias y hongos, el fosfato de carbamilo es sintetizado por una reacción diferente, catalizada por otro enzima, la carbamil fosfato sintetasa II (glutamina).

2. - El fosfato de carbamilo producido en la mitocondria cede después su grupo carbamilo a la ornitina, que se forma en el citosol, pero que penetra en la mitocondria a través de un sistema de transporte específico de la membrana interna. El producto es la citrulina.

Fosfato de Carbamilo + ornitina -----> citrulina + Pi

Esta reacción es catalizada por la ornitina carbamil transferasa de la matriz mitocondrial. La citrulina formada abandona después la matriz mitocondrial, pasando al citosol, en el que tienen lugar las restantes reacciones del ciclo de la urea.

3. - El segundo grupo amino necesario para la síntesis de urea llega ahora en forma de aspartato que lo adquirió a su vez del glutamato por acción de la aspartato transaminasa en el citoplasma. El grupo amino del aspartato se condensa reversiblemente con el átomo de carbono carbamílico de la citrulina en presencia del ATP, para formar argininosuccinato; esta reacción es catalizada por la arginino succinato sintetasa.

Citrulina + aspartato + ATP -----> argininosuccinato +  
AMP + PPi

El pirofosfato formado en esta reacción queda hidrolizado por la pirofosfatasa, a fosfato inorgánico, impulsando, de este modo, la reacción global hacia la derecha.

4. - En la reacción siguiente, el argininosuccinato experimenta una reacción de eliminación en  $\alpha$ , por acción de la argininosuccinato liasa para formar arginina libre y fumarato.

Argininosuccinato -----> arginina + fumarato

5. - La arginina formada en esta reacción se transforma en el precursor inmediato de la urea, mientras que el fumarato retorna al conjunto de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxílicos.

Hasta este punto, la secuencia de reacción es la empleada por todos los organismos capaces de efectuar la biosíntesis de la arginina. Sin embargo, únicamente los animales ureotélicos poseen cantidades elevadas de arginasa, la cual separa la urea de la arginina, reacción que tiene lugar en el citosol:

Arginina + H<sub>2</sub>O -----> ornitina + urea

La arginina se sintetiza de nuevo a partir de la ornitina, por carbamilación de esta última a citrulina, a expensas del fosfato de carbamilo y seguida de la adición de un

grupo amino a la citrulina procedente del ácido aspártico.

Las enzimas que catalizan las reacciones suministradoras de grupos amino al ciclo de la urea, ( aspartato transaminasa, glutamato deshidrogenasa, carbamil fosfato sintetasa y ornitina carbamil transferasa ) se hayan localizadas en las mitocondrias de la célula hepática, proporcionando de este modo una compartimentación muy compleja de las reacciones del catabolismo de aminoácidos y de la síntesis de urea entre el citosol y las mitocondrias. Esta separación parece necesaria para impedir la acumulación de amoníaco libre en la sangre, el cual es sumamente tóxico para los vertebrados ureotélicos, particularmente para el sistema nervioso central.

#### POLIAMINAS Y METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS:

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

La ornitina disponible para éstas reacciones proviene del plasma, además de que puede formarse dentro de las células por acción de la arginasa. Por esta razón se ha pensado que la arginasa puede ser una de las enzimas que regulan la etapa inicial en la biosíntesis de poliaminas, además de su participación fisiológica relacionada con el ciclo de la urea, donde ha sido tradicionalmente estudiada.

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

Elgavish, Wallace y colaboradores ( 32 ) estudiaron "in vitro" el efecto directo de las poliaminas en las funciones características de membranas empleando como modelo vesículas de membrana de células ciliadas renales proximales encontrando que las poliaminas putrescina, espermidina y espermina, estimulan la elevación intracelular de los niveles de D - glucosa. La elevación de la L - glucosa difundida no fue alterada, indicando con esto que las poliaminas afectan la actividad del transporte de D - glucosa, antes que inducir cambios no específicos en las propiedades lipídicas de la membrana.

La espermina fue incorporada dentro del ácido tricloroacético en la fracción insoluble de las proteínas de la membrana de las células ciliadas. Los resultados indican que este proceso de incorporación consiste de por lo menos dos componentes: un componente  $Ca^{++}$  independiente y otro componente  $Ca^{++}$  dependiente, posiblemente como resultado de la actividad de la transglutaminasa presente en las células ciliadas de las membrana renales aisladas ( 32 ).

Muchos estudios recientes han sugerido un posible papel regulatorio de las poliaminas en el proceso de endocitosis de ciertas hormonas polipeptídicas. Hay evidencias que sugieren que la transglutaminasa puede participar en el proceso de internalización regulado por aminoras. Otros estudios han demostrado que el efecto de las aminoras no es necesariamente a nivel de la membrana plasmática y que esto se puede deber a un efecto sobre el proceso intracelular de los complejos receptores ligantes ( 32, 33 ).

El efecto de las poliaminas sobre la elevación de glucosa en las vesículas de membrana de células ciliadas renales de conejo usadas para el estudio de Elgavish ( 35 ) son semejantes a los modelos de elevación reportados en estudios anteriores. En presencia de putrescina, espermidina o espermina, 50  $\mu\text{M}$  el rango de elevación inicial es significativamente estimulado ( FIGURA 2 ) mientras el equilibrio permanece estabilizado, lo que indica que las poliaminas no provocan alteración en el volumen intravesicular ( 35 ).

En otros estudios realizados por Elgavish y sus colaboradores ( 32 ) se ha demostrado que las poliaminas estimulan el transporte de D - glucosa y la actividad de ATPasa en las vesículas de membrana de células ciliadas renales aisladas. El efecto sobre el transporte de glucosa puede ser debido a un efecto directo de las poliaminas sobre la glucosa llevada a las células ciliadas renales o puede ser el resultado de un efecto indirecto sobre el transporte de glucosa como consecuencia de la inhibición de los mecanismos de elevación del sodio.

Se ha demostrado que las poliaminas también estimulan el transporte de glucosa en las células adiposas ( 32, 34 ). Se ha propuesto que este efecto es el resultado de la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  el cual se ha demostrado que estimula el transporte de la glucosa en las células adiposas. La presencia de la enzima diaminoxidasa, que puede utilizar putrescina como sustrato para producir  $\text{H}_2\text{O}_2$  ha sido demostrada en el riñón de puerco ( 32 ).

El hecho de que las poliaminas estimulen dos funciones aparentemente no relacionadas, transporte de glucosa y actividad de ATPasa, indican que su efecto puede ser el resultado de modificaciones más generales de las propiedades de la membrana ( 32 ).

En la incubación de adipocitos de rata con insulina, espermidina o espermina, se estimula la conversión de glucosa a dióxido de carbono y se inhibe la lipólisis, estos efectos han sido observados cuando las concentraciones de poliaminas varían entre 1 - 50  $\mu\text{M}$ .

Cuando se utilizan concentraciones elevadas de espermidina y espermina, el aumento de la oxidación de la glucosa y la supresión de la lipólisis son idénticos a los efectos producidos por insulina. Se ha reportado que las poliaminas también estimulan el transporte de D - glucosa a través de la membrana ( 32, 34 ).

El mecanismo por el cual la espermidina y la espermina

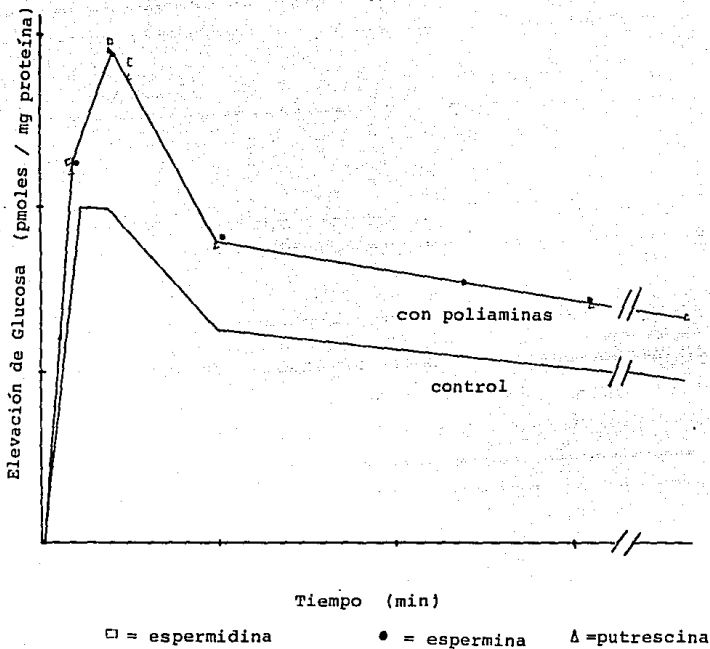


FIGURA 2 : Efecto de las poliaminas sobre la elevación de la D-glucosa en las vesículas de membrana de células ciliadas renales ( 32 ).

tienen acciones parecidas a la insulina no está muy estudiado, sin embargo, se sabe que no se debe a la fuerza iónica de estas moléculas, ya que al someter al mismo estudio a los adipocitos de rata, la putrescina ( de fuerza iónica similar ) no presenta este comportamiento, por lo que se cree que la inhibición de la lipólisis inducida con epinefrina o teofilina se inhibe por las poliaminas, sin embargo cuando se administra dibutiril AMPc esta acción no se produce ( 35 ).

Recientemente se ha demostrado que algunas enzimas de la vía glucolítica como la hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa del sitio de implantación de la rata son activadas significativamente por espermina. Otras enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos, como la glucosa 6 - fosfato deshidrogenasa, también son moduladas por poliaminas ( 35 ).

#### PANCREAS:

Las concentraciones tisulares de poliaminas han sido determinadas en algunos órganos. Se sabe que el páncreas de rata contiene 9.32 moles de espermidina / g de peso húmedo a diferencia del cerebro humano que únicamente contiene 0.23.

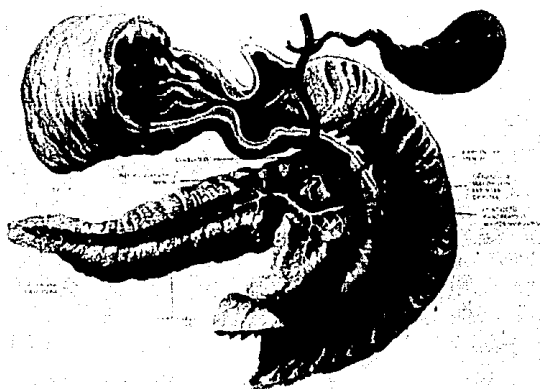
#### Función exocrina:

El páncreas ( ESQUEMA 1 ) es la principal fuente de enzimas (  $\alpha$  - amilasa, quimotripsinógeno, etc. ) que actúan sobre el duodeno, yeyuno, y en menor cantidad en el íleon. En los seres humanos la síntesis de enzimas pancreáticas es de aproximadamente 16 g de proteína por día. El páncreas de rata que sólo contiene 0.2 g de proteína en sus tejidos sintetiza cerca de 0.4 g de proteína enzimática en 24 horas. El páncreas también secreta bicarbonato al cual neutraliza el contenido ácido que el estómago pasa al duodeno. Esta secreción lleva el pH a un valor de 6 - 7 en el duodeno lo cual permite que las enzimas digestivas actúen con mayor eficacia.

#### Función endócrina:

El páncreas posee una función endócrina que se lleva a cabo en los islotes de Langerhans. Aunque aproximadamente hay un millón de islotes repartidos por todo el páncreas sólo representan alrededor del 1% del peso total de este órgano, no obstante su bajo porcentaje, los islotes pancreáticos desempeñan





ESQUEMA 1: Fotografía del páncreas humano.

un papel importante en el control del metabolismo, ya que además de insulina, producen tres hormonas: Glucagón, ( una proteína antagonista de la acción de la insulina pues eleva los niveles de glucosa en sangre ) polipéptido pancreático, ( regula la liberación de las enzimas digestivas pancreáticas ) y somatostatina ( una proteína que inhibe la secreción de las hormonas producidas por los islotes ).

Cada islote de Langerhans aloja aproximadamente a 300 células productoras de hormonas. Mediante la exposición de cortes de islotes a anticuerpos específicos para cada hormona, reforzada por el marcaje de estos anticuerpos con una molécula fluorescente, se ha demostrado que cada hormona se sintetiza en un diferente tipo de célula. Los islotes contienen tres principales tipos de células, alfa, beta, y delta, que se distinguen entre sí por su morfología y sus características de coloración. Las células beta, que constituyen cerca del 60 % del total secretan insulina directamente a la circulación sanguínea. Las células alfa, alrededor de 25 % del total, secretan glucagón. Por último las células delta, cerca del 10 % del total, secretan somatostatina. Las células PP secretan una hormona, de función aún no aclarada, que se llama polipéptido pancreático.

Las estrechas interrelaciones entre estos distintos tipos celulares de los islotes de Langerhans permiten la regulación directa de la secreción de algunas de las hormonas por las otras. Por ejemplo: la insulina inhibe la secreción de glucagón y la somatostatina inhibe la secreción tanto de insulina como de glucagón ( 36 ).

#### Insulina:

En los islotes de Langerhans se encuentran las células beta, las cuales producen insulina. La insulina afecta el metabolismo de las grasas y las proteínas casi tanto como el de los carbohidratos.

La insulina es una pequeña proteína con peso molecular de 5808 en el caso de la especie humana. Está compuesta por dos cadenas de aminoácidos conectadas entre sí por enlaces disulfuro (una cadena A, que consiste de 21 aminoácidos y una cadena B, que consta de 30 aminoácidos). Cuando se separan ambas cadenas de aminoácidos se pierde la actividad funcional de la molécula de insulina ( 36 ).

En 1960, se descubrió el mecanismo de ensamblaje de esta proteína. Donald F. Steiner y colaboradores, incubaron células con aminoácidos marcados con un isótopo radiactivo. Las células incorporaron los aminoácidos en las proteínas, quedando así al descubierto por su marcador radiactivo. Así se descubrió que la insulina se sintetizaba realmente como fragmento de una

proteína mayor: Proinsulina. Posteriormente se descubrió que los ribosomas no sintetizaban insulina ni proinsulina sino una molécula precursora mayor que la proinsulina, la cual fue denominada Preproinsulina.

El páncreas humano contiene aproximadamente 200 unidades de insulina y se secretan 50 unidades por día, por tanto, poca insulina se almacena y se debe sintetizar con mucha rapidez.

#### Efectos:

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

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

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

#### Acción Biológica:

La insulina aumenta la utilización de glucosa, facilitando así su transporte al interior de la célula, en especial las de los tejidos adiposo y muscular. Su actividad es selectiva ya que sólo transporta hexosas y pentosas que tienen la misma configuración en los primeros tres carbonos que la D - glucosa. La insulina incrementa la velocidad de oxidación de la glucosa en la célula en particular por la vía glucolítica y aumenta la síntesis de glucógeno especialmente en hígado y músculos esqueléticos. La insulina impide la liberación de glucosa del hígado inhibiendo a la enzima intracelular glucosa - 6 fosfatasa. El resultado neto de todos los efectos de la insulina, es disminuir la concentración de glucosa en sangre.

La insulina promueve la lipogénesis activando la lipasa de lipoproteína e impide la lipólisis inhibiendo la lipasa sensible a la hormona. El efecto neto es disminuir la concentración de ácidos libres y triacilglicérolos en el plasma.

La insulina aumenta la velocidad de captación de  $K^+$  por células y por lo tanto disminuye la concentración de  $K^+$  en sangre.

La concentración de glucosa en la sangre es el principal factor que controla la liberación de insulina. El mecanismo que regula la secreción de insulina también es sensible a la concentración de aminoácidos en el plasma.

## DIABETES:

La diabetes es una enfermedad crónica que afecta el metabolismo de los carbohidratos, de las grasas y de las proteínas. En general se puede decir que la diabetes se debe a la deficiencia en la acción o en la secreción de la insulina. Existen varios factores que influyen en la incidencia de la diabetes: Genéticos y Ambientales. ( Cuadro 1 )

### Factores que la producen:

1) Insulino Dependiente ( Tipo 1 ): Esta resulta de una severa falta de insulina. El bajo nivel de insulina en el plasma, se puede atribuir a una reducción en la masa de células beta del páncreas, que es característico de este tipo de diabetes. Se dice que la probable pérdida de las células beta es debida a: infección viral, vulnerabilidad genética y autoinmunidad ( 37 ).

El modo de acción es el siguiente: el virus causa una infección en el páncreas, entonces se libera una reacción de autoinmunización donde los antígenos liberados atacan a las células beta dañadas. ( FIGURA 3 )

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

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

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

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

### Sintomatología:

El nivel de glucosa sanguínea en las personas que presentan diabetes es anormalmente elevado (hiperglucemia), se excreta una gran cantidad de glucosa en la orina (glucosuria), además la excreción de orina es en grandes cantidades o

"CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS"

CUADRO I

CLASE	TERMINOLOGIA COMUN	FACTORES ASOCIADOS	CARACTERISTICAS CLINICAS
Diabetes mellitus tipo I o Diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM)	Diabetes Juvenil o Diabetes Inestable	Presencia de reacciones de autoinmunidad. Factores Genéticos y de medio ambiente.	Absoluta ausencia de insulina. Requiere inyección de insulina para prevenir cetoacidosis y preservar la vida. Puede aparecer a cualquier edad, pero es más común en la juventud.
Diabetes mellitus tipo II o Diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM)	Diabetes mellitus adulta o Diabetes estable	Factores genéticos y del medio ambiente. No hay asociación con antígenos. Obesidad.	Los niveles de insulina pueden ser normales elevados y bajos. Se presenta en la mayoría de los casos después de los 40 años. Del 60 al 90% de los pacientes son obesos. Alrededor del 85% de las personas con diabetes pertenecen a este tipo. Tratamiento: dieta,

"CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS"

CUADRO I

CLASE	TERMINOLOGIA	FACTORES	CARACTERISTICAS
	COMUN	ASOCIADOS	CLINICAS
OTROS TIPOS:			ejercicio y si es necesario hipoglicemiantes orales tales como las sulfonilureas.
Diabetes mellitus Gestacional (GDM)	Algunas veces denominada Intolerancia a la glucosa en el embarazo.	Metabolismo de glucosa anormal durante el embarazo. La aparición de la diabetes puede ocurrir inmediatamente después del nacimiento o varios años después.	Diabetes Mellitus.
Diabetes Secundaria		Enfermedad pancreática Enfermedades hormonales Inducido por medicamento Anomalías en el receptor de insulina.	Similares a la Diabetes mellitus Tipo I.

(38)

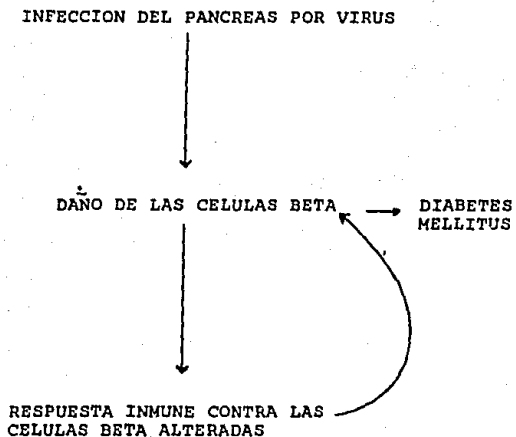


FIGURA 3 : Esquema simplificado para mostrar la interacción entre la infección viral y la autoinmunidad. (37)

volumenes. También se presenta un aumento en la sed debido a la pérdida de agua, hay un aumento en el apetito, pérdida de peso muy notoria y debilidad muscular.

Las personas que tienen diabetes tipo 1 presentan: poliuria (eliminación excesiva de orina), polidipsia (ingestión excesiva de agua), polifagia (ingestión exagerada de alimentos), pérdida de peso y astenia (falta de energía). Bioquímicamente presentan aumento en la concentración de glucosa en sangre y concentraciones elevadas de glucosa en orina. La cetoacidosis junto con coma puede presentarse en cualquier momento. Esta cetoacidosis se debe a la producción de cuerpos cetónicos, éstos se forman por una oxidación excesiva e incompleta de los ácidos grasos en el hígado.

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

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

En la diabetes tipo 2 se tienen afecciones en los pequeños vasos capilares, arteriosclerosis, afecciones del riñón, de la visión y del sistema nervioso. A pesar de que estos pacientes también presentan anomalías metabólicas regularmente son más ligeras y controlables; casi nunca se presenta cetoacidosis ( 39 ).

#### Tratamiento:

El tratamiento de la diabetes se aplica de acuerdo a la naturaleza de la enfermedad y a la eficacia de los regímenes disponibles de tratamiento.

La dieta se da en forma individual para adaptarse a las necesidades de cada paciente. Debe ser nutritiva y bien equilibrada teniendo como meta la reducción de peso en pacientes obesos mediante la disminución calórica. También se sugiere la práctica de ejercicio.

Los hipoglucemiantes bucales (sulfonilureas) estimulan la producción de insulina en los islotes de Langerhans.

La administración de sulfonilurea en el diabético no obeso, restaura la fase inicial de liberación de insulina. Las sulfonilureas no se recomiendan para diabéticos insulino dependientes, ya que las sulfonilureas dependen de la función de las células beta para producir su efecto sobre el nivel de glucosa en sangre. Ejemplos de las sulfonilureas son: Tolbutamida, Clorpropamida, Acetohexamida, etc ( 40 ).

La administración de insulina está indicada para los diabéticos tipo 1 y para diabéticos tipo 2.



Existen diferentes preparaciones comerciales de insulina que varían con respecto a la que se obtiene de la especie animal en la pureza y solubilidad, también difieren en el tiempo de inicio y duración de su efecto biológico (aproximadamente 40 formulaciones). La insulina se vende con concentración de 100 unidades / ml ( 100 U ) en ampollas de 10 ml.

La mayoría de las preparaciones de insulina contienen impurezas las cuales aumentan la inmunogenicidad de la insulina por lo que hasta ahora no ha sido satisfactorio el resultado del tratamiento por restitución de insulina. Además de lo anterior, en la actualidad no es posible reproducir por completo el patrón fisiológico normal de la secreción de insulina hacia la vena porta ( 40 ).

#### EFFECTOS DEL SUMINISTRO DE ARGININA SOBRE LA FUNCION PANCREATICA:

La arginina es un aminoácido nutricionalmente importante para el crecimiento del hombre. Puede ser sintetizada por las ratas, pero no en cantidades suficientes para permitir el crecimiento normal. Los microorganismos biosintetizan la arginina a partir del glutamato utilizando intermediarios N - acetilados. (FIGURA 4 ) ( 41 )

Se ha demostrado que la arginina a semejanza del polipéptido inhibitorio gástrico ( GIP ) es un fuerte potenciador de la liberación de insulina en presencia de altas concentraciones de glucosa ( 42 ).

Raymond y colaboradores ( 42 ) investigaron los efectos del GIP en la liberación de insulina y glucagón con diferentes concentraciones de glucosa y arginina en el páncreas perfundido de rata. Ya con anterioridad se había demostrado que la glucosa ejerce un efecto opuesto sobre las células alfa y beta mientras que la arginina estimula la liberación de insulina y glucagón. (FIGURA 5 ) En esta figura se muestra también que el efecto del GIP sobre las células alfa y beta depende de la concentración de glucosa presente. Los experimentos que manejan concentraciones de glucosa por arriba y por abajo de 5.5 mM indican el efecto dramático de la glucosa en la acción del GIP, particularmente en las células beta. (FIGURA 6A Y 6B )

El GIP produce una respuesta bifásica a la insulina en presencia de elevados niveles de glucosa ( FIGURA 5B ). Así como también una liberación de glucagón estimulada por arginina (en presencia de bajas concentraciones de glucosa) con un incremento efectivo conforme aumenta la concentración de arginina ( FIGURA 7 ).

Se sabe que la glucosa interactúa con la arginina en las células alfa y beta. Algunos reportes indican que el GIP interactúa con ambas glucosa y arginina en ambos sitios ( 42 ).

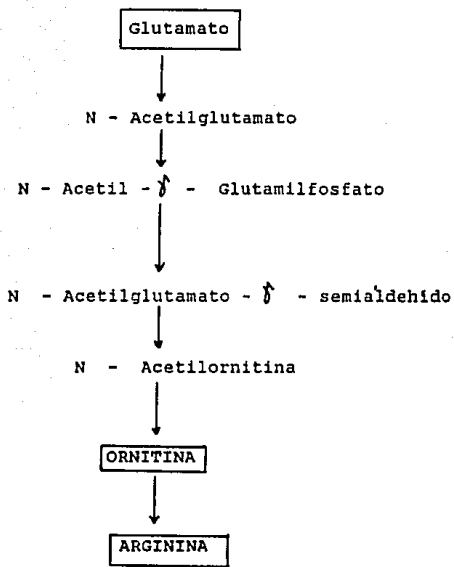


FIGURA 4: Biosíntesis de la arginina a partir del glutamato utilizando intermediarios N - acetilados. (41)

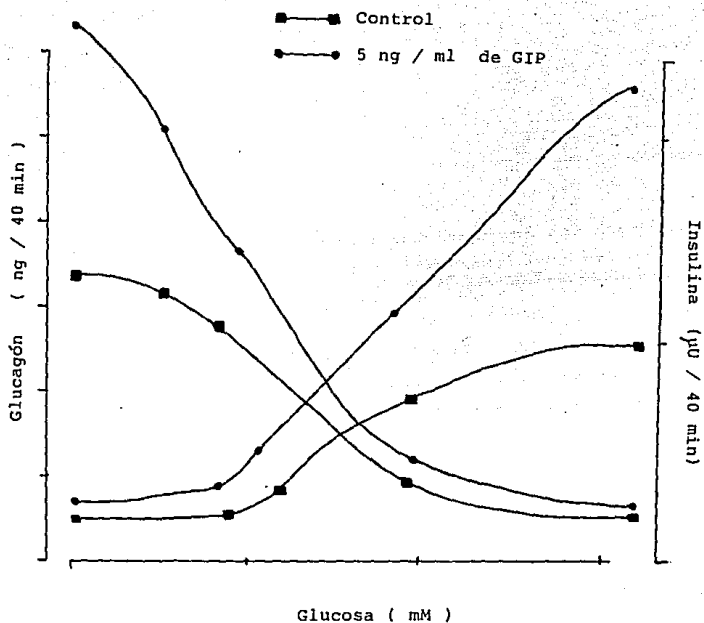


FIGURA 5 : Comparación del efecto de la concentración de glucosa sobre la liberación de insulina y glucagón en el páncreas de rata perfundido en presencia o ausencia de 5 ng / ml de GIP. ( 42 )

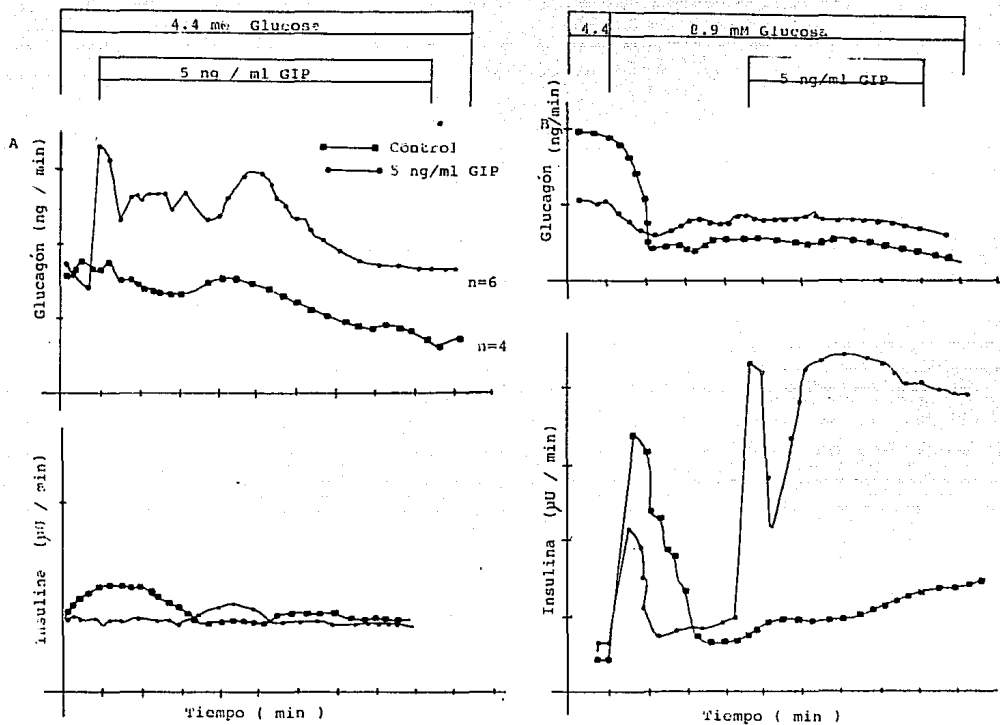


FIGURA 6A y 6B : Efecto de una infusión de 5 ng / ml de GIP sobre la liberación de insulina y glucagón en presencia de 4.4 mM (A) y 8.9 mM (B) de glucosa (42 ).

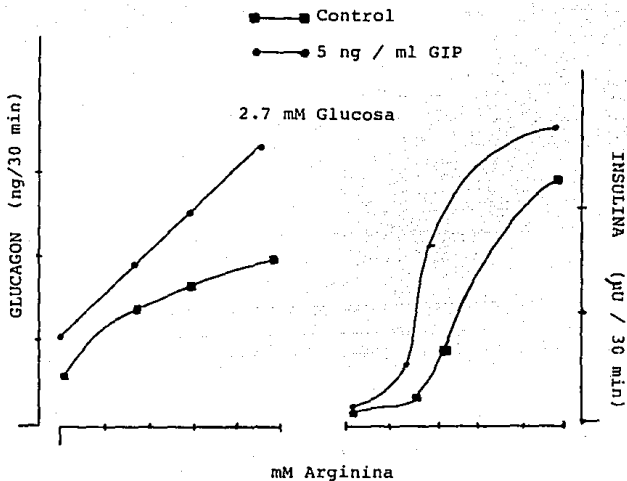


FIGURA 7: Efecto del GIP ( 5 ng/ ml ) sobre la liberación de insulina y glucagón en presenciade arginina y glucosa Cada punto representa el total de hormona liberado durante infusiones de glucosa (2.7 mM ) separadas cada 30 minutos y concentraciones variables de arginina en presencia o ausencia de GIP ( 42 )

En la FIGURA 8 se observa el efecto de la concentración de glucosa introducida en el páncreas de rata perfundido con relación al estímulo del GIP y la arginina.

La arginina también estimula la secreción de somatostatina, en forma similar a la glucosa. Pietro y colaboradores ( 44 ) investigaron el efecto de la insulina sobre la liberación de somatostatina en páncreas de rata aislado y perfundido bajo condiciones basales y durante la estimulación con glucosa o arginina. Los resultados presentados demuestran que la secreción de somatostatina estimulada por glucosa y arginina puede ser inhibida por un incremento en la concentración de insulina sobre las células delta pancreáticas.

Leslie y colaboradores ( 44 ) han propuesto que la somatostatina de las células delta de los islotes pancreáticos inhibe el glucagón pancreático y la secreción de insulina por un mismo mecanismo paracrino ( 45, 48 ). Para la realización de estos estudios se usó [ D - Ala<sup>5</sup>, D - Trp<sup>8</sup> ] somatostatina (SSa) ; un análogo de la somatostatina para demostrar el papel de la somatostatina pancreática en la determinación de la respuesta del glucagón a agentes estimulantes como arginina y morfina, encontrándose que la respuesta del glucagón a la arginina se incrementa cuando la somatostatina pancreática se suprime. Igualmente, el mejoramiento en la secreción de glucagón ocurre en la fase del nivel de incremento basal de insulina ( 47, 48 ). Por lo que puede parecer que la inhibición de la secreción basal de somatostatina es responsable de la mayoría en la respuesta del glucagón a la arginina. Porque la arginina actúa directamente sobre las células alfa ( 49 ).

De los aminoácidos que influyen en la secreción de insulina y glucagón la arginina ha sido el más frecuentemente estudiado. Este aminoácido, en ausencia de glucosa, estimula la secreción de glucagón " in vitro ". No se ha observado un efecto consistente sobre la secreción de insulina. Sin embargo, en presencia de glucosa, la arginina es un potente estimulador de la liberación de insulina tanto " in vivo " como " in vitro " ( 50 - 53 ).

Esto ha llevado a sugerir que la arginina puede causar la liberación de insulina al facilitar la acción de la glucosa. ( 54, 58, 60 ).

Gerich y sus colaboradores ( 60 ) además de probar lo anterior trataron de dilucidar los mecanismos a través de los cuales la glucosa y la arginina afectan la función de las células alfa y beta, empleando para ello páncreas de rata perfundido, obteniendo resultados similares a los reportados en otros sistemas. Así Coore y Randle ( 61 ) usaron fracciones de páncreas de conejo. Otros investigadores utilizando segmentos de páncreas e islotes aislados de rata han confirmado lo anterior.

Los efectos de la glucosa sobre la secreción de glucagón son parecidos a los observados " in vivo " en el hombre y en los perros, así como en estudios " in vitro " empleando la

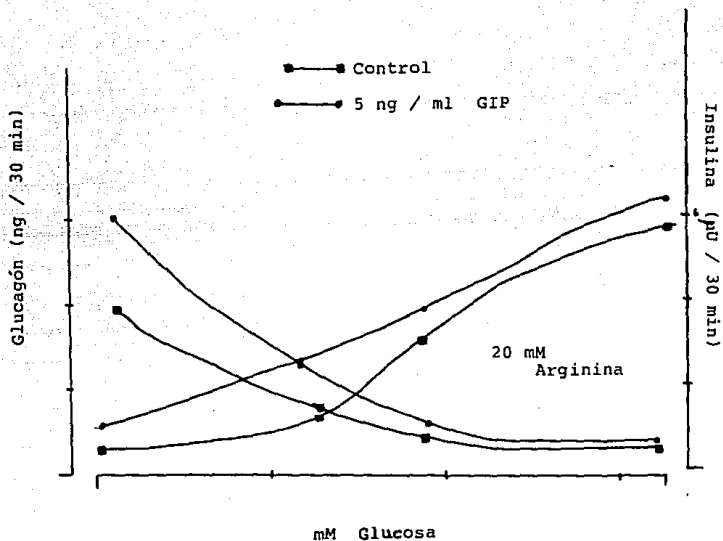


FIGURA 8 : Efecto del GIP ( 5 ng / ml ) sobre el total de insulina y glucagón liberado durante infusiones de Arginina ( 20 mM ) cada 30 minutos y concentraciones variables de glucosa. ( 42 ).

técnica de páncreas perfundido la cual indica que las células alfa pancreáticas son bastantes reactivas a la glucosa ( 62 - 65 ).

Aunque un gran número de investigadores han confirmado que la arginina es capaz de estimular la liberación de insulina en ausencia de glucosa, otros investigadores han fallado en demostrar estos efectos, esto se atribuye al uso de concentraciones subestimuladoras de arginina y sistemas de incubación estáticos los cuales pueden ser poco sensibles para detectar bajos niveles de insulina liberada en el páncreas aislado de rata y perfundido ( 52 - 50 ).

Aunque la glucosa y la arginina puede cada uno afectar la secreción de insulina por más de un mecanismo ( 60, 66, 67 ) esta falta de competencia sugiere que la glucosa y la arginina no actúan en sitios receptores similares sobre las células beta.

Gerich y colaboradores ( 65 ) demostraron que la arginina es un estimulador extremadamente potente de la secreción de glucagón. Esta respuesta del glucagón a la arginina puede ser representativa de la respuesta de las células alfa a los aminoácidos en general. Se sugiere también que la glucosa y la arginina actúan vía diferentes mecanismos en las células alfa, ya que es muy obvio el hecho de que la glucosa inhiba la secreción de glucagón mientras la arginina lo estimula.

Alba - Roth y colaboradores ( 69 ) realizaron estudios acerca del posible efecto estimulante de la arginina sobre la secreción de la hormona del crecimiento, por una supresión de la secreción de somatostatina endógena. Los resultados indican que la arginina administrada con GHRH ( factor liberador hipotalámico de la hormona del crecimiento ) provocó los más altos niveles de hormona de crecimiento ( GH ) en suero más que una estimulación máxima a dosis de GHRH o arginina sola. Esto permite concluir que los efectos de la estimulación de la arginina son mediados por la supresión en la secreción de somatostatina endógena ( 68 ).

Weir y colaboradores ( 71 ) realizaron estudios en páncreas aislado perfundido de perro con exclusión ducenal para examinar la producción de hormonas de islotes en respuesta a arginina, glucagón exógeno e insulina. Observándose que el glucagón exógeno estimula la secreción de somatostatina e insulina en forma bifásica mientras que la arginina tiene un efecto similar sobre el glucagón, somatostatina y polipeptido pancreático. El fracaso de la arginina para provocar una respuesta de la insulina puede probablemente ser atribuido a las bajas concentraciones de glucosa del tejido perfundido, porque en otros estudios empleando tejido perfundido con altas concentraciones de glucosa, se encontró una liberación bifásica. La demostración de que ciertas células de islotes pueden ser influenciadas por productos de secreción de otras células de islotes aumenta la posibilidad de que mecanismos paracrinós complejos puedan ser operativos dentro de los islotes. Es claro que estas cuatro hormonas ( glucagón, insulina, somatostatina y polipeptido pancreático ) son liberadas rápidamente en respuesta



a la arginina, aunque las interrelaciones e implicaciones precisas en el metabolismo de nutrientes todavía no han sido elucidada ( 70, 71 ).

Existen varias vías metabólicas que utilizan ornitina, producto de la reacción catalizada por arginasa entre ellas la síntesis de glutamato, prolina y poliaminas. Dada la importancia que tiene la ornitina para la biosíntesis de poliaminas se propuso este estudio para determinar la actividad de arginasa en el tejido pancreático humano comparandose la actividad de esta enzima en tejido normal con la actividad en el tejido pancreático afectado por alguna patología. Bajo la hipótesis de que la actividad de arginasa es menor en el páncreas de individuos con algún daño pancreático comparada con la del tejido pancreático normal.

## MATERIAL Y METODOS:

### MATERIAL BIOLÓGICO:

Se emplearon fracciones de páncreas humano (cabeza, cuerpo y cola) obtenidos de autopsias de pacientes que no presentaban daño pancreático ( controles ), de pacientes con diabetes mellitus tipo II así como de pacientes con daño pancreático por alcoholismo. El tiempo entre la defunción del paciente y la toma de la muestra fue en promedio de 8 h para todas las muestras. Estas fueron proporcionadas por el Servicio de Patología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional.

### MATERIAL QUÍMICO:

Se utilizaron los reactivos necesarios para la determinación de arginasa, proteínas, peso seco, DNA, alfa-amilasa y triacilgliceroles.

### METODO:

#### - Procedimiento experimental:

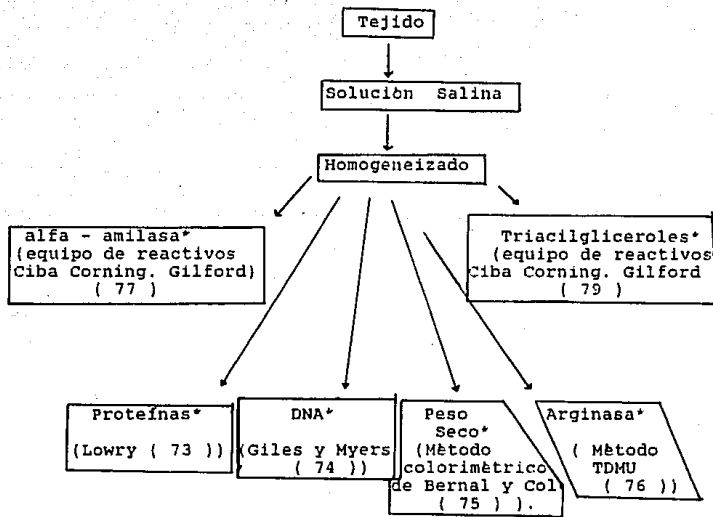
Se analizaron 10 muestras de páncreas humano normal, 3 muestras de páncreas humano diabético y 3 muestras de páncreas dañado por alcoholismo.

Las muestras de páncreas ( perfectamente identificada cada porción ) se colocaron en frascos de 15 ml que contenían un amortiguador de fosfatos 0.05 M pH = 7.2 al momento de realizarse la autopsia, procediendo inmediatamente después a congelarlos hasta el momento de ser procesada la muestra ( 36 - 72 h ).

#### - Procesamiento:

Cada fracción de páncreas se colocó en solución salina 0.9 % con el objeto de eliminar coágulos y tejido conectivo. Una vez realizada esta operación se colocó la fracción sobre un papel filtro para eliminar el exceso de agua y se pesó.

El tejido se homogenizó con un homogenizador del tipo Potter - Elvehjen en 3.5 ml de solución salina. El homogenizado se dividió en seis fracciones para hacer las diferentes determinaciones bioquímicas:



\* Ver Apéndice.

## RESULTADOS:

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de las actividades de arginasa, alfa - amilasa y la concentración de triacilglicéridos de las diferentes fracciones de páncreas humano normal ( cabeza, cuerpo y cola ).

Los valores de las determinaciones de DNA, proteínas y peso seco se presentan en la tabla 2.

En la figura 9 se presenta la comparación de la actividad de arginasa expresada en nmoles urea / mg proteína · min en las diferentes fracciones del páncreas normal y afectado por diabetes mellitus o pancreatitis causada por alcoholismo.

En la figura 10 se presenta la comparación de la concentración de proteínas expresada como mg proteína / mg peso seco en los diferentes tejidos pancreáticos estudiados.

En la figura 11 se compara la concentración de DNA expresada como mg DNA / mg peso seco.

En la figura 12 se compara la concentración de triacilglicéridos endógenos expresados en función del contenido de peso seco. La actividad de alfa - amilasa endógena de las diferentes fracciones tisulares se muestra en la figura 13 y se expresa como U / mg de proteína.

Con los resultados de la actividad de arginasa en el páncreas humano obtenidos en el laboratorio se establecieron dos tablas comparando la actividad de la enzima que se obtuvo en el páncreas humano con la reportada en la literatura para diferentes tejidos de rata tales como el hígado, intestino delgado, riñón, páncreas, pulmón, timo y cerebro ( tabla 3 ) y humanos ( hígado, fibroblastos, riñón y eritrocitos ) ( tabla 4 ) en los cuales la actividad de la enzima ya había sido demostrada.

En la figura 14 se presentan las variaciones de la actividad de la arginasa con respecto a la edad en el tejido pancreático humano normal.

"VALORES DE DIFERENTES PARAMETROS BIOQUIMICOS  
EN TEJIDO PANCREATICO HUMANO"

(TABLA I)

FRACCION DE TEJIDO	# EXPERIMENTOS	ARGINASA (nmoles urea/mg proteína/min )	TRIACILGLICERIDOS ( mg / mg peso seco)	ALFA-AMILASA (U / mg prot)
Cabeza	10	29.73 ± 12.84	0.043 ± 0.032	0.206 ± 0.09
Cuerpo	10	25.32 ± 10.43	0.032 ± 0.026	0.248 ± 0.12
Cola	10	25.57 ± 9.19	0.040 ± 0.027	0.265 ± 0.14

"VALORES DE DIFERENTES PARAMETROS BIOQUIMICOS  
EN TEJIDO PANCREATICO HUMANO"

(TABLA 2 )

FRACCION DE TEJIDO	# EXPE- RIMENTOS	PROTEINAS (mg prot/mg p.s.)	PROTEINAS (mg prot/ mg p. h.)	DNA (mg DNA/ mg p.s.)	DNA (mg DNA/ mg p.h.)	PESO SECO mg p. s./ mg p.h.
Cabeza	10	$0.648 \pm 0.16$	$0.100 \pm 0.035$	$0.060 \pm 0.015$	$7.83 \times 10^{-2}$ $\pm 3.01 \times 10^{-2}$	$0.153 \pm 0.03$
Cuerpo	10	$0.519 \pm 0.12$	$0.087 \pm 0.033$	$0.058 \pm 0.019$	$6.41 \times 10^{-2}$ $\pm 3.96 \times 10^{-2}$	$0.137 \pm 0.04$
Cola	10	$0.529 \pm 0.16$	$0.082 \pm 0.026$	$0.048 \pm 0.011$	$7.37 \times 10^{-2}$ $\pm 2.57 \times 10^{-2}$	$0.148 \pm 0.04$

"COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE ARGINASA EN PANCREAS HUMANO Y DIFERENTES TEJIDOS DE RATA"

( TABLA 3 )

FRACCION DE TEJIDO	# EXPERIMENTOS	ACTIVIDAD DE ARGINASA ( $\mu$ moles de urea / g de tejido)
Pancreas Humano:		
Cabeza	10	32.16 $\pm$ 11.07
Cuerpo	10	27.92 $\pm$ 5.91
Cola	10	23.29 $\pm$ 7.62
Promedio	10	27.79 $\pm$ 8.20
Rata: *		
Hígado	5	669 $\pm$ 37
Intestino Delgado	3	75 $\pm$ 8
Riñon	5	42 $\pm$ 3
Páncreas	3	24 $\pm$ 3
Pulmón	3	2.5 $\pm$ 1
Timo	3	0.9 $\pm$ 0.3
Cerebro	5	0.8 $\pm$ 0.1

\* (82)

"ACTIVIDAD DE ARGINASA EN DIFERENTES TEJIDOS HUMANOS"

( TABLA 4 )

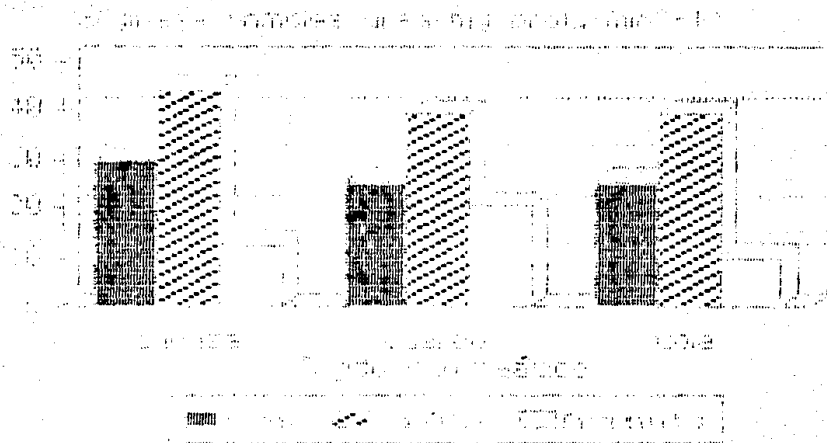
FRACCION DE TEJIDO	# EXPERIMENTOS	ACTIVIDAD DE ARGINASA (nmoles urea/mg prot.hr)	DESVIACION ESTANDAR
<b>Pancreas:</b>			
Cabeza	10	1783.86	± 770.94
Cuerpo	10	1519.51	± 625.98
Cola	10	1534.57	± 551.54
Hígado*	8	58,120.20	± 33,850
Fibroblastos*	5	82	± 44
Rinon*	7	3620	± 860
Eritrocitos*	4	3470	± 1030

\* (83)



FIGURA 9:

# ACTIVIDAD DE ARGINASA COMBINACIÓN

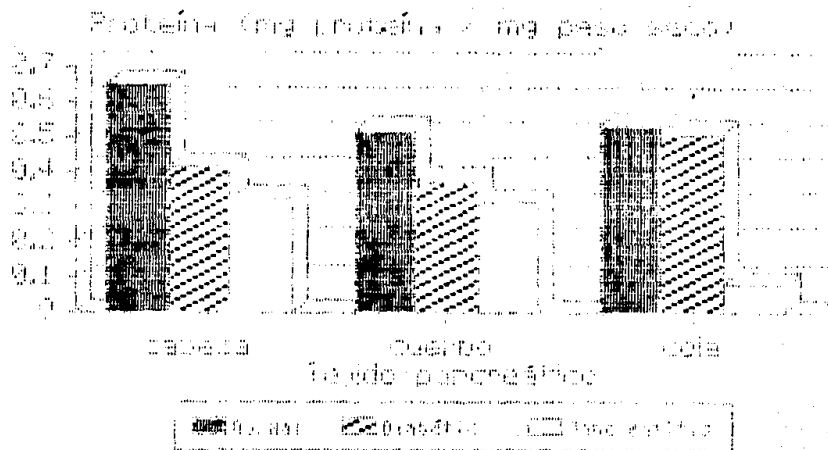


Actividad de Arginasa en el Sero de Ratas

FIGURA 10:

# CONCENTRACION DE PROTEINA

## Comparación



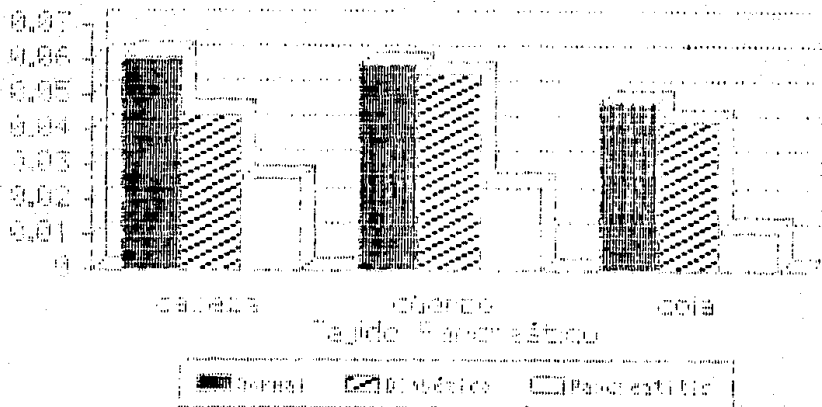
Nota: Muestra de laboratorio.

FIGURA 11:

## CONCENTRACION DE DNA

Concentración

500 ( mg DNA / mg peso seco )



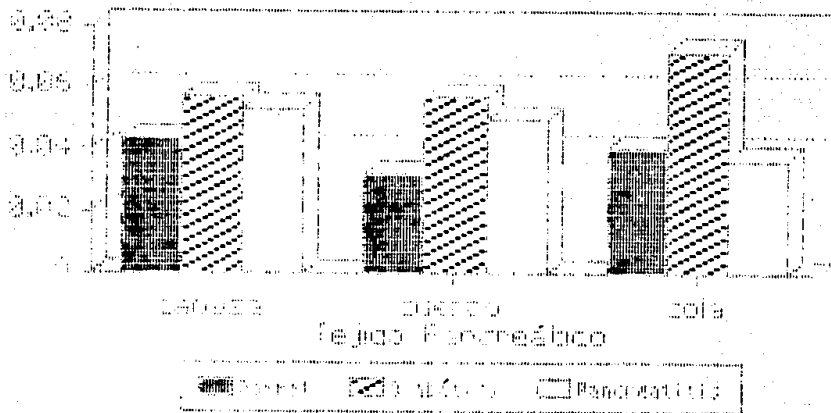
Los datos obtenidos en el laboratorio

FIGURA 12:

## TRIPALCILGLICERIDOS

### Comparación de la concentración

Triacilglicéridos (mg / mg base seca)



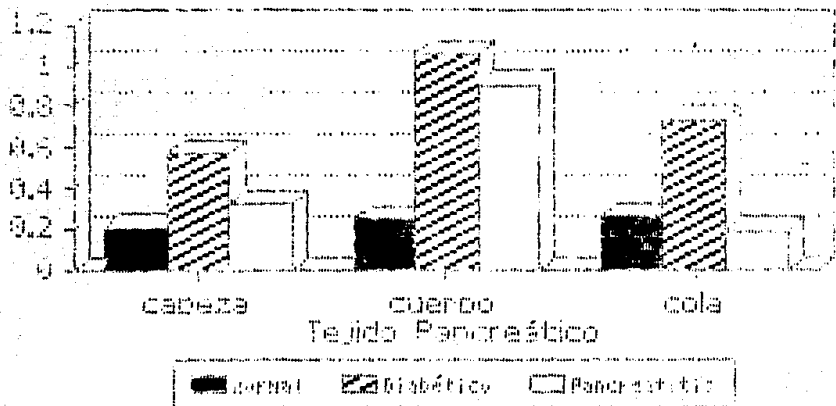
datos obtenidos en el laboratorio

FIGURA 13:

## ALFA - AMILASA

### Comparación de la concentración

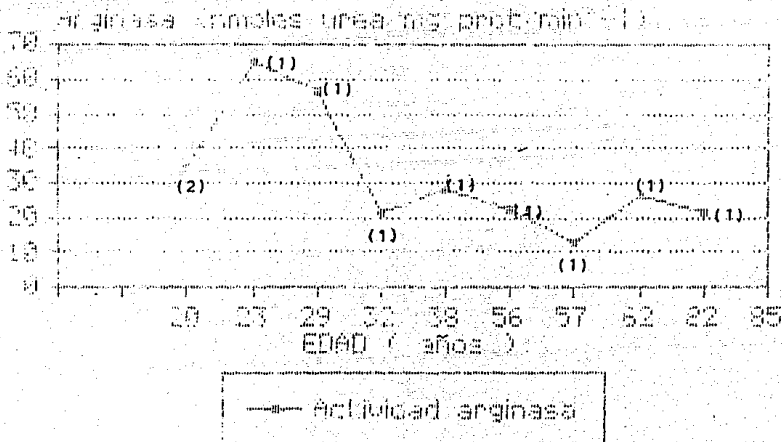
Alfa-amilasa ( U / mg proteína )



datos obtenidos en el laboratorio

FIGURA 14:

## ACTIVIDAD DE ARGINASA En plasma humano por edades



Los datos obtenidos en el laboratorio.

( ) = número de muestras.

## DISCUSION DE RESULTADOS:

En el hombre la actividad de arginasa ha sido ampliamente estudiada en el hígado, fibroblastos y riñón ( 82 ). A la arginasa ampliamente distribuida en diferentes tejidos (25) extrahepáticos se le atribuye la función de facilitar la disponibilidad de ornitina para la biosíntesis de poliamininas, esto parece especialmente atractivo ya que estas moléculas policatiónicas tienen un papel clave en el crecimiento de células y de tejidos.

En este estudio se demostró la presencia de arginasa en el tejido pancreático humano y se comparó esta actividad con la del hígado, riñón y eritrocitos reportada por otros autores ( 83 ). Se observó que la actividad de arginasa es menor en el tejido pancreático con respecto a los otros tejidos, lo que nos permite sugerir una posible relación entre el papel funcional de la enzima en el metabolismo celular y sus características moleculares en diferentes tejidos, ya que ha sido reportado que las arginasas de hígado y riñón tienen propiedades diferentes relacionadas con la función del tejido ( 83 ).

La actividad de arginasa también ha sido estudiada en diferentes tejidos de animales, particularmente en la rata donde la actividad ha sido descrita en intestino delgado ( 80 ), pulmón y cerebro ( 82 ), tiroides, bazo, corazón, piel, músculo esquelético, glándula mamaria lactante ( 81 ), útero, etc.

Harri y colaboradores ( 82 ) demostraron que la actividad de arginasa en el páncreas de rata macho de 90 días de edad es de  $24 \pm 3$   $\mu$ moles de urea / g de tejido lo que comparado con los resultados obtenidos en este estudio en el que se ha utilizado páncreas humano normal refleja una actividad similar reportada como  $27.78 \pm 4.43$   $\mu$ moles de urea / g de tejido siendo este el promedio de las tres fracciones del páncreas estudiadas.

Los resultados obtenidos no muestran variación significativa en la actividad de arginasa en cada una de las fracciones del páncreas ( cabeza, cuerpo y cola ) ( tabla 1 ). Lo que indica que a pesar de que en la cola del páncreas se localiza el mayor número de islotes de Langerhans la existencia de dos tipos de islotes ( 84 ) cuya distribución no es homogénea permite que la actividad de la enzima se manifieste de manera similar en todo el tejido. Los islotes tipo I que son agregados centrales de células beta están rodeados por células alfa y delta, provienen invariablemente de la cola, cuerpo y de la parte posterior de la cabeza del páncreas ( parte dorsal o esplénica ). Los islotes tipo II constituidos por células del polipéptido pancreático ( pp ) se encuentran en lugar de las células alfa y se localizan en la parte media e inferior de la cabeza ( región pancreática ventral o duodenal ).

Al comparar la actividad de arginasa del tejido pancreático de individuos con daño pancreático causado por

alcoholismo con la actividad del tejido pancreático normal se observa actividad menor de esta enzima en el tejido dañado, lo que puede ser debido a una inhibición en la síntesis de DNA y consecuentemente de proteínas ( FIGURA 9 - 13 ).

Otros estudios que se han realizado en pacientes con este padecimiento han demostrado una franca reducción en la función endocrina, documentada por el porcentaje de prevalencia de diabetes mellitus o por curvas repetidas de tolerancia a la glucosa, por lo que conviene investigar regularmente glucemia en este tipo de pacientes.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la fracción del páncreas en la que hay una notoria disminución tanto de la actividad de arginasa como del resto de los parámetros bioquímicos es la cola del páncreas. Esto puede atribuirse a una destrucción parcial de los islotes de Langerhans ya que histológicamente predomina la fibrosis irregular con destrucción y pérdida permanente del parenquima exócrino cuando se presenta un daño pancreático provocado por alcoholismo.

Cuando hay una falta de insulina se observa que el metabolismo de las grasas se estimula y la síntesis de proteínas disminuye, como consecuencia de esto, su almacenamiento se detiene y aumenta su catabolismo. La estimulación en el metabolismo de las grasas se manifiesta como causa de la hidrólisis de los triacilglicéridos almacenados, lo que produce liberación de grandes cantidades de ácidos grasos y glicerol a la sangre circulante. Esto se controla mediante la administración de insulina o bien de algún agente que estimule su producción ( hipoglicemiantes ).

En este estudio se observó que en el caso del páncreas diabético la actividad de arginasa se encuentra incrementada con respecto a los valores reportados para el tejido pancreático normal. Esto puede atribuirse al uso de sulfonilureas como agentes hipoglicemiantes orales para el control de la diabetes. Estudios "in vivo" del efecto de las sulfonilureas en sujetos diabéticos no insulino dependientes ( 85 ) son difíciles de interpretar, ya que como cualquier droga su efecto directo no puede ser separado de los efectos secundarios mediados vía un incremento en la secreción de insulina o mejorando el control metabólico.

Estas drogas reducen la glucosa en sangre por un aumento en la liberación de insulina endógena, esto se debe a un efecto directo sobre los islotes pancreáticos.

Debido a que las sulfonilureas son potentes estimuladores de la secreción de insulina además de mejorar la síntesis de ácidos grasos no esterificados "in vitro" aparentemente independiente a la insulina se puede pensar que pueden estar afectando la actividad de arginasa ya que se ha demostrado que puede estar relacionada entre otras funciones con la biosíntesis de poliaminas cuya presencia ha sido también asociada con la producción de insulina.



También en el caso de las muestras de páncreas diabético se observó que hay una ligera disminución en la concentración de DNA y proteínas con respecto al páncreas normal esto puede atribuirse a que cuando los niveles de insulina no son los adecuados hay una disminución en la síntesis de proteínas aumentando el catabolismo de las mismas.

Los triacilglicéridos medidos en el páncreas diabético presentan un aumento con respecto al páncreas humano normal lo que puede atribuirse a que aparentemente las sulfonilureas aumentan la síntesis de ácidos grasos no esterificados es decir provocan una estimulación en el metabolismo de las grasas.

La alfa - amilasa medida en las fracciones de páncreas diabético también presenta un incremento con respecto al páncreas normal, esto puede atribuirse a una estimulación en general de la actividad enzimática del tejido debida a las drogas administradas para mantener el control metabólico.

Cuando la actividad de arginasa se compara conforme a la edad, se observa un ligero aumento de la actividad entre los 20 y 30 años, posteriormente la actividad disminuye y permanece sin cambios importantes después de esta edad. Esto puede explicarse ya que la actividad de arginasa se afecta por secreciones hormonales las cuales incrementan la actividad de esta enzima siendo la actividad hormonal en esta edad todavía elevada ( 85 ).

## CONCLUSIONES:

1.- La disminución de la actividad de arginasa en el tejido pancreático dañado puede atribuirse a una liberación aumentada de la enzima en el suero.

2.- El aumento en la actividad de arginasa en el tejido pancreático afectado por diabetes puede relacionarse con el efecto de hipoglicemiantes.

3.- La actividad de arginasa encontrada en el páncreas humano puede estar relacionada entre otras funciones con la biosíntesis de poliaminas cuya presencia ha sido asociada con la producción de insulina.

4.- La cuantificación de la actividad de arginasa en suero se podría emplear como un apoyo para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades pancreáticas.

## A P E N D I C E:

### TECNICAS PRACTICADAS EN EL LABORATORIO:

#### PROTEINAS:

##### FUNDAMENTO:

Desde que fue propuesto el uso del reactivo de Folin para la determinación de proteínas, se han reportado gran número de modificaciones analíticas en el procedimiento de uso de este reactivo. El Reactivo de Folin presenta ciertas peculiaridades y limitaciones, se ha estudiado con relación a efectos en variaciones de pH, tiempo de reacción, concentración de reactivos y sustancias que interfieren. Las reacciones a las que se debe el color final atribuible a presencia de proteína son: a) reacción con el cobre en alcali y b) reducción del reactivo fosfomolibdico - fosfotungstico por la proteína tratada con cobre

##### REACTIVOS:

###### Reactivo A:

Carbonato de Sodio al 2%  
Tartrato doble de sodio y potasio  
Hidróxido de Sodio 0.1 N

###### Reactivo B:

Solución de Sulfato de Cobre Pentahidratado al 0.5%

###### Reactivo C:

Mezclar 50 volúmenes del Reactivo A en 1 volumen de Reactivo B. Al momento de usarse.

###### Reactivo D:

Reactivo de Folin - Ciocalteu (diluido)

Solución Estándar de Albumina Bovina 0.2 mg / ml

##### APARATOS:

Vórtex.  
Colorímetro.

**TECNICA:**

Se colocan 100  $\mu$ l del homogenizado de páncreas con 0.5 ml de hidróxido de sodio 1 N. Se calienta en baño a 37°C durante 30 min. Posteriormente se centrifuga. Se diluye el sobrenadante obtenido 1: 10. Se toma una alícuota de 200  $\mu$ l completando a 500  $\mu$ l con agua.

Se adicionan 2 ml de reactivo C, se mezcla en el vórtex y se deja reposar 10 minutos. Finalmente se adicionan 0.2 ml del reactivo D, se mezcla y se deja reposar 30 minutos. Leer en el colorímetro a 530 nm.

**DNA:****FUNDAMENTO:**

Muchos tejidos contienen bajas concentraciones de DNA y en ciertas circunstancias es necesario utilizar un método sensible para su determinación.

En 1956 Burton propuso una modificación al método utilizado hasta entonces por Dische la modificación consistió en usar difenilamina en una mezcla de ácido acético y sulfúrico. En la reacción se adiciona acetaldehído permitiendo el desarrollo de color. Este método es 35 veces más sensible que el original de Dische.

Posteriormente el Método de Burton fue modificado haciendolo aún más sensible. En este método modificado el acetaldehído debe agregarse aislado al final y no incorporado a la mezcla de reactivos, lo que permite disminuir la absorbancia del blanco hasta una tercera parte del método original. La adición de ácido sulfúrico es innecesaria ya que la muestra de tejido se encuentra en HClO<sub>4</sub> 2M, lo que simplifica el método produciendo un mayor desarrollo de color. Es esencial que la difenilamina sea preparada al momento. La sensibilidad del método es casi duplicada al aumentar la concentración de difenilamina de 2 al 4 %.

**REACTIVOS:**

Reactivo A:

Acido Perclórico 2 N

Reactivo B:

Acetaldehído 1.6 mg / ml

Reactivo C:

Difenilamina 4 % ( 400 mg / 10 ml Ac. Acético )

Solución Estándar de DNA: solución isotónica de DNA diluída 1 : 10 con el reactivo A. ( 1 mg / ml ).

**TECNICA:**

Colocar en 0.9 ml de  $HClO_4$  0.010 M 100  $\mu$ l de homogeneizado; este se centrifuga 10 minutos a 3000 rpm. Separar el sobrenadante y al precipitado se le agrega 0.5 ml  $HClO_4$  1 M. Incubar 30 minutos a 70 °C. Centrifugar. Tomar una alícuota de 200  $\mu$ l y completar a 500  $\mu$ l con el reactivo A. Adicionar 50  $\mu$ l del reactivo B y posteriormente 500  $\mu$ l de reactivo C. Incubar 18 hrs a 37°C. Leer a 600 nm.

**PESO SECO:**

**FUNDAMENTO:**

El método consiste en hacer reaccionar muestras biológicas con una solución ácida de dicromato de potasio y enseguida determinar la densidad óptica a 560 nm del producto formado.

El método es insensible a compuestos inorgánicos y, por lo tanto, puede ser aplicado a homogeneizados de tejidos preparados en soluciones inorgánicas. La única desventaja del método es que parece que el dicromato reacciona específicamente con grupos que contienen carbono y, por lo tanto, la participación del nitrógeno u otros elementos en la composición del material biológico darán proporcionalmente menor absorbanza.

**REACTIVOS:**

**Reactivo A:**

1 g de dicromato de potasio se coloca en 50 ml de ácido sulfúrico concentrado. Calentar a 70°C. Se prepara antes de usarse.

Solución Estándar de Manosa o Manitol 2 mg / ml.

**APARATOS:**

Parrilla Eléctrica.

Colorímetro.

Vortex.

**TECNICA:**

Tomar 50  $\mu$ l de homogeneizado los cuales se diluyen en 950  $\mu$ l de agua. Posteriormente se adicionan 2 ml del reactivo A frío. Se mezcla y se enfría ( se puede enfriar al chorro del agua ). Leer a 660 nm.

## ARGINASA:

### FUNDAMENTO:

La actividad de arginasa se ha establecido por mediciones de: a) una disminución de la concentración de arginina, b) un incremento en la concentración de ornitina o c) incremento en la concentración de urea. Muchos de estos métodos han sido desarrollados por Righetti y colaboradores ( 75 ), quienes han hecho notar que solo algunos procedimientos son útiles para medir la actividad de arginasa en extractos de tejido u homogeneizados. El método que emplea tiosemicarbazida - diacetilmonoxima - urea ( TDMU ) es un método rápido para determinar actividad de arginasa en tejido homogeneizado. La aparición del color en este método donde se determina la cantidad de urea depende del tiempo de calentamiento y de la temperatura. Aunque el tiempo requerido para la aparición máxima del color es dependiente de la temperatura, la intensidad de la reacción disminuye conforme aumenta el tiempo de calentamiento a temperaturas cercanas a 35°C. Lo que indica que el producto es afectado por la temperatura.

### REACTIVOS:

#### Reactivo A:

Diacetilmonoxima	3.5 ml
Tiosemicarbazida	0.035 g
c. b. p.	25 ml

#### Reactivo B:

0.1 ml $FeCl_3$ 0.12 M en $H_2PO_4$	56.7%
100 ml $H_2SO_4$ al 20%	

Solución Estándar de Urea 15 ug / ml

### APARATOS:

Parrilla Eléctrica.  
Colorímetro.

### TECNICA:

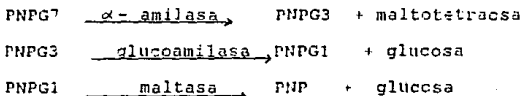
Colocar 300  $\mu$ l de homogeneizado en 0.5 ml de buffer (  $MnCl_2$  0.002 M, Tris HCl 0.04 M, sol. salina 0.9% ). Calentar a 55 °C durante 1 hr para activar a la enzima. Centrifugar a 3000 rpm . Diluir 1 : 10. Tomar 0.9 ml y adicionar 0.1 ml de una mezcla Arg (0.4 M) - Gly ( 0.15 M ) . Incubar a 37 ° C, 15 minutos. Posteriormente introducir los tubos en agua hirviendo por 7 minutos. Centrifugar. Tomar una alícuota de 300  $\mu$ l

completar a 1 ml con agua. Adicionar 1 ml del reactivo A, 2 ml del reactivo B y calentar 25 minutos a 95°C. Enfriar y leer a 530 nm.

#### ALFA - AMILASA:

##### FUNDAMENTO:

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



##### REACTIVOS:

Juego de reactivo GILFORD para determinación cuantitativa de  $\alpha$  - amilasa.

##### APARATOS:

Espectrofotómetro UNICAM SP - 1800  
Baño de 37°C.

##### TECNICA:

- 1.- Ajustar el espectrofotómetro a cero con agua destilada o desionizada. Leer a 405 nm.
- 2.- Añadir 0.040 ml de agua o muestra problema a los tubos de ensayo.
- 3.- Adicionar con pipeta 1 ml de reactivo a cada uno de los tubos de ensayo. Mezclar y permitir que se lleve a cabo la reacción.
- 4.- Después de un periodo de 1 minuto de incubación a 37°C en la cubeta, anotar la absorbancia ( $A_{405}$ ) y hacer una lectura cada 15 segundos durante un minuto ( $A_{60}$ ).

### CALCULOS:

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

$$\alpha\text{-amilasa (U/L)} = \frac{A/\text{min} \cdot 10^6 \cdot 1.04}{(8.9 \times 10^3) \cdot 1 \cdot 0.04} = A/\text{min} \cdot 3921$$

Donde:

- A = incremento en absorbancia a 405 nm
- $8.9 \times 10^3$  = absorbancia molar de PNF a 405 nm y 37° C ( $8.9 \times 10^3$  litros:  $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )<sup>6</sup>
- $10^6$  = factor de conversión de moles a  $\mu$  moles
- 1 = recorrido de la luz en cm
- 1.04 = volumen total de reacción en ml
- 0.04 = volumen de la muestra en ml

### TRIACILGLICEROLES:

#### FUNDAMENTO:

El glicerol producido por hidrólisis enzimática de triacilgliceroles es fosforilado por adenosinatrifosfatasa (ATP) para producir 1 - glicerofosfato y ADP en la reacción catalizada por gliceroquinasas ( GK ). La glicerofosfato - deshidrogenasa ( G - 1 - PDH ) cataliza la oxidación del 1 - glicerofosfato en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido (  $\text{NAD}^+$  ) para producir NADH que es usado para reducir la anilina del cloruro de 2 - tetrazolio ( iodofenil - p ) - 3 - ( nitrofenil - p ) - 5 - fenil ( INT ) a formazan en la reacción catalizada por diaforasa. El formazan absorbe la luz a 500 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glicerol y por lo tanto, a la concentración de triacilgliceroles. El procedimiento de ensayo de triacilgliceroles ( color ) de Gilford es una modificación de la metodología de Wahlefeld. ( 77 )

Triacilgliceroles  $\xrightarrow{\text{Lipasa}}$  glicerol + Acidos Grasos

Glicerol + ATP  $\xrightarrow{\text{GK}}$  1 - Glicerofosfato + ADP



1 - Glicerofosfato + NAD<sup>+</sup>  $\xrightarrow[3 - 1 - PDH]{}$  Fosfato de Dihidroxiacetato + NADH

NADH + INT  $\xrightarrow{\text{Difarisa}}$  Formazan + NAD<sup>+</sup>

**REACTIVOS:**

Juego de reactivo GILFORD para determinación cuantitativa de triacilglicérolos

**APARATOS:**

Espectrofotómetro UNICAM SP - 1800.  
Baño de 37°C.

**TECNICA:**

- 1.- Ajustar el espectrofotómetro a cero con agua destilada o desionizada. Leer a 508 nm.
- 2.- Adicionar con pipeta 1 ml de reactivo a tubos de ensayo adecuadamente marcados.
- 3.- A intervalos regulares de tiempo añadir 0.01 ml de agua, calibrador, o a la muestra desconocida a cada tubo de ensayo. Mezclar bien y controlar el tiempo de reacción.
- 4.- Leer la absorbancia después de 18 pero antes de 30 minutos, a temperatura ambiente ( 18 - 25 °C ).

**CALCULOS:**

$$\text{Concent. Triacilgli-} = \frac{A_{\text{desc}} - A_{\text{bl}}}{A_{\text{cal}} - A_{\text{bl}}} \cdot \text{Conc. del calibra-}$$

roles dor.

## BIBLIOGRAFIA:

- ( 1 ) Méndez J. D. y Hicks J. J. (1983) Metabolismo y función de poliaminas en células vegetales. Rev. Soc. Quim. Mex. 27 (4): 169 - 173.
- ( 2 ) Méndez J. D. : Poliaminas en: Bioquímica e Inmunología. Vol. II. Hicks, J. J. y Zagoya, J. C. ( Eds ) Facultad de Medicina, UNAM. México, 1989.
- ( 3 ) Méndez J. D. y Hicks J. J. (1987). Metabolismo y función de poliaminas en microorganismos. Rev. Soc. Quim. Mex. Vol. 31: 17 - 23.
- ( 4 ) Campbel, A. R., Hunt - Retzlaff, Z., Russ, J. E. : Polyamines in health an disease. In: Physiology of polyamines. Bachrach, U. and Heimer, Y. ( Eds ) CRC Press, Inc. Florida, 1987.
- ( 5 ) Lehninger, A. L.: Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona, España. pp 573, 736 - 750. ( 1983 ).
- ( 6 ) Konarska, L., Wiesmann, U. and Colombo, J. P.: Arginase activity in human fibroblast cultures. Clin. Chim. Acta., 115: 85 - 92, 1981.
- ( 7 ) Pohjanpelta, P. and Holttä, E. : Arginase activity of different cells in tissue culture. Biochim. Biophys. Acta., 757 : 191 - 195, 1983.
- ( 8 ) Méndez, J. D., Yáñez, R., Wong, C. and Hicks, R. : Uterine arginase inhibition affect the rat embryonic development. Contraception., 33 : 597 - 604, 1986.
- ( 9 ) Spector, E. B., Rice, S. C., Kern, R. M., Hendrikson, R. and Cderbaum, S. D.: Comparison of arginase activity in red blood cells of lower mamals, primates and man: evolution to high activity in primates. Am. J. Hum. Genet. 37 ( 5 ): 1138 - 45, 1985.
- ( 10 ) Baranczyk - Kuzma, A., Skrzypek - Osiecka, I., and Porembaska, Z.: Arginase form human blood serum. Biochem. Med., 26: 174 - 184, 1981.
- ( 11 ) Jakway, J. and Morris, H.: Serum factors required for arginase induction in macrophages. Cellular, Immunol., 54 : 253 - 263, 1980.

( 12 ) Farram, E. and Nelson, D. : Mechanism of action of mouse macrophages as antitumor effector cells: role of arginase. *Cell. Immunol.*, 55 ( 2 ) : 293 - 293, 1983.

( 13 ) Terayama, H., Koji, T., Kontani and Myokumoto, T. : Arginase as an inhibitory principle in liver plasma membranes arresting the growth of various mammalian cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.*, 720 : 182 - 191, 1982.

( 14 ) Verma, A. and Boutwell, B. : Characterization of arginase activity from mouse epidermis and its relation to ornithine decarboxylase induction by the tumor - promoting agent, 12 - O - tetradecanoylphorbol - 13 - acetate. *Biochim. Biophys. Acta.*, 677: 184 - 189, 1981.

( 15 ) Haggerty, D. F., Spector, E. B.: Regulation by glucocorticoids of arginase and argininosuccinate synthetase in cultured rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 257 ( 5 ) : 2246 - 2253, 1982.

( 16 ) Spector, E. B., Cotta - Dethlefs, H., Kein, R. M. : The rate of injected arginase in the rabbit. *Am. J. Hum. Genet.*, 34 " 474. 1982.

( 17 ) Reddy, P. U. M. and Romana Rao, J. V. : Inhibition of arginase in sheep brain homogenates by some L - aminoacids. *Experientia.*, 37 : 914, 1980.

( 18 ) Davis, P. and Paulus, T. : Uses of arginaseless cells in the study of polyamine metabolism ( *Neurospora crassa* ). *Methods Enzimol.*, 94 : 112 - 116, 1983.

( 19 ) Pace, C. and Landers, R. : Arginase inhibition. *Biochem. Biophys. Acta.*, 658 ( 2 ) : 410 - 412, 1981.

( 20 ) Skog, S., Eriksson, V. and Eliasson, E.: Arginase and - phase enzyme in a human cell line. *Biochim. Biophys. Acta.*, 672 : 33 - 44, 1981.

( 21 ) Aguirre, R. and Kasche, V.: Catalytically active monomer forms of immobilized arginase. *Eur. J. Biochem.* 57: 307 - 314, 1982.

( 22 ) Remesar, X., Arola, Ll., Palou, A., and Alemany, M.: Arginase activity during pregnancy and lactation. *Horm. Metab. Res.*, 16: 468 - 470, 1984.

( 23 ) Ruegg, U. and Russell, A.: A rapid and sensitive assay for arginase. *Anal. Biochem.*, 102: 206 - 212, 1980.

( 24 ) Carvajal, N., Acona, M., and Rodriguez, J. P. : Evidence for cooperative effects in human liver arginase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 701 : 146 - 148, 1982.

( 25 ) Spector, E. B., Riece, S. C. H. and Cederbaum, S. D. : Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase deficient patients. *Pediatric. Res.* 17 ( 12 ) : 941 - 944, 1983.

( 26 ) Cheung, C. and Rajzman, L. : Arginine, mitochondrial arginase and the control of carbamyl phosphate synthesis. *Archives of Biochem. and Biophys.*, 209: 643 - 649, 1981.

( 27 ) Matsuzaki, S., Suzuki, M. and Hamana, K: A possible role of arginase in the regulation of polyamine biosynthesis in the rat thyroid. *Acta Endocrinol. ( Copenh )*, 98 ( 1 ) : 57 - 61, 1981.

( 28 ) Holttä, E. and Pohjanpelto, P.: Polyamine dependence of chinese Hamster ovary cells in serum - free culture is due to deficient arginase activity, *Biochem. Biophys. Acta.*, 721: 321 - 327, 1982.

( 29 ) Spector, E. B., Rice, S. C., Kern, R. M., Hendrikson R. and Cederbaum, S. D.: Comparison of arginase activity in red blood cells of lower mammals, primates and man: evolution to high activity in primates. *Am. J. Hum. Genet.*, 37 ( 6 ) : 1138 - 1145, 1985.

( 30 ) Bernar, J., Hansen, R. A., Phoenix, P., Shaw, N. F. and Cederbaum, S. D. : Arginase deficiency in a 12 years old boy with impairment of intellectual function. *J. Pediatr.*, 108 ( 3 ) : 432 - 5, 1986.

( 31 ) Kanalas, J. J., Spector, E. B. and Cederbaum, S. D.: Hollow - Fiber Reactors containing mammalian arginase: an approach to enzyme replacement therapy. *Biochem. Med.*, 27: 46 - 55, 1982.

( 32 ) Elgavish, A., Robert, W., Pillion, J. D., and Meezan, E.: Polyamines stimulate D - glucose transport in isolated renal brush - border membrane vesicles. *Bioche. Biophys. Acta.*, 777: 1 - 8, 1984.

( 33 ) Campbell, A. R., Hunt - Retzlaff, Z., Russ, J. E. : Polyamines in health and disease. In: *Physiology of polyamines.* Bachrach, U. and Heimer, Y. (Eds) CRC PRESS, Inc. Florida, 1987.

( 34 ) Lockwood, D. H., Lipsky, J. J., Maronk, F. and East, L. E. : Actions of polyamines on lipid and glucose metabolism of fat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44 ( 3 ) : 600 - 607, 1971.

- ( 35 ) Dodds, R. A., Dunham, J., Bitensky, L. and Chayen, J. : Putrescine, may be a natural stimulation of glucose - 6 - phosphate dehydrogenase. FEBS letters 201 ( 1 ) : 105 - 108, 1986.
- ( 36 ) Misael Uribe, Tratado de Medicina Interna. Vol I. Editorial Médica Panamericana. México, 1988.
- ( 37 ) Craighead, J. E. : Current views on the etiology of insulin - dependent diabetes mellitus, New England Jour. Med. 299 : 1439 - 1443, 1980.
- ( 38 ) Krall, P. L. and Beaser, S. R. Joslin Diabetes Manual. Lea & Febiger. 12 ed. Philadelphia, 1989. pp 15 - 19.
- ( 39 ) Harper, H. : Manual de Química Fisiológica. Ed. El Manual Moderno., sexta edición. México, 1978. pp 524 - 525.
- ( 40 ) Metz, R. : On that elusive disorder - hypoglycemia. Executive health report, 21 ( 2 ) : 1 - 4, 1984.
- ( 41 ) Martin W. David. Bioquímica de Harper. El Manual Moderno. 10 a ed. México, 1986. p 287.
- ( 42 ) Brown, J. C., Dryburgh, S. A., Ross, S. A., and Dupre, J. : Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide, Recent Prog. Horm. Res. 31 : 487, 1975.
- ( 43 ) Pederson, R. A. and Brown, C. J. : Interaction of gastric inhibitory polypeptide, glucose and arginine on insulin and glucagon secretion from the perfused rat pancreas. Endocrinology, 103 : 610 - 615, 1978.
- ( 44 ) Klaff J. L. and Taborsky, G. J. : Role of pancreatic somatostatin in determining glucagon response to arginine and morphine. Am. J. Physiol., Jun 252 ( 6 Pt 1 ) : E 751 - 5, 1987.
- ( 45 ) Gerber, P. G., Trimble, E. P., Wollheim, C. B. and Renold. A. E. : Effect of insulin on glucose - and arginine - stimulated somatostatin secretion from the isolated perfused rat pancreas. Endocrinology, 109 : 279 - 283, 1981.
- ( 46 ) Seino, Y., Nishi, S. and Imura, H. : Vagal modulation of arginine - and glucagon induced pancreatic somatostatin secretion. Life Sciences 37 : 651 - 656, 1985.
- ( 47 ) Weir, G. C., Loo, S. S., Patel, Y. C. and Gabbay, K. H. : Somatostatin and pancreatic polypeptide secretion. Effects of glucagon, insulin and arginine. Diabetes, 38 ( 1 ) : 35 - 40, 1989.

( 48 ) Efendic, S., Lins, P. E. and Cerasi, E. : Potentiation and inhibition of insulin release in man following priming with glucose and with arginine - effect of somatostatin. *Endocrinol. Acta.* 90 : 259 - 271, 1979.

( 49 ) Pipeleers, D. G., Schurt, F. C., Van Schravemdijk, C. F. H. and Van De Winkel, M. : Interplay of nutrients and hormones in the regulation of glucagon release. *Endocrinology* 117 : 817 - 823, 1985.

( 50 ) Rocha, D. M., Faloona, G. H. and Unger, R. H. : Glucagon - stimulating activity of 20 aminoacids in dogs. *J. Clin. Invest.* 51 : 2346 - 2351, 1972.

( 51 ) Pagliara, A. S. and Matschinsky, F. : Interactions between glucose and aminoacids in and cells of the isolated perfused rat pancreas. Program of the 55 th Annual Meeting of the Endocrine Society. A - 169. ( Abstr. 241 ), 1973.

( 52 ) Frankel, B., Gerich, R., Hagura, R. E., Franska, G. C. and Gredsky, G. M. : Abnormal secretion of insulin and glucagon by the "in vitro" perfused pancreas of the genetically diabetic Chinese Hamster. *J. Clin. Invest.* 53 : 1637 - 1646, 1974.

( 53 ) Milner, R. D. G. : The stimulation of insulin release by essential aminoacid from rabbit pancreas "in vitro". *J. Endocrinol.* 47: 347 - 356, 1970.

( 54 ) Basabe, J., Lopez, N., Viktora, J., and Wolff, F. : Insulin secretion studied in the perfused rata pancreas I. Effect of tolbutamide, leucine and arginine, their interaction with diazoxide and relation to glucose. *Diabetes* 20 : 449 - 456, 1971.

( 55 ) Edgar, P., Rabinowitz, E., and Merimee, J. J. : Effects of aminoacid on insulin release from excised rabbit pancreas. *Endocrinology* 84: 835 - 843, 1969.

( 56 ) Fajans, S. S. and Floyd, J. C. : Stimulation of islet cell secretion by nutrients and by gastrointestinal hormones released during digestion. *Handb. Physiol.* 1 ( Sect 7 ): 473 - 493, 1972.

( 57 ) Floyd, J. C., Fajans, S., Pek, C. A., Thiffault, R. F. and Conn J. W. : Synergistic effect of certain aminoacids and glucose upon insulin secretion in man. *Diabetes* 16: 510 - 511, 1967.

( 58 ) Efendic, S., Cerasi, E. and Luft, R. : Role of glucose in arginine - induced insulin release in man. *Metab. (Clin. Exp.)* 20 : 568 - 579, 1971.

( 59 ) Levin, S. R., Grodsky, R., Hagura, D. F. and Forsham, P. H.: Relationships between arginine and glucose in the induction of insulin secretion from the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology* 90: 624 - 631, 1972.

( 60 ) Malaisse, W. J.: Insulin secretion: multifactorial regulation for a single process of release. *Diabetologia* 9 : 157 - 173, 1973.

( 61 ) Malaisse, W. J., Malaisse - Lagae, F. and Wright, P. H.: A new method for the measurement " in vitro " of pancreatic insulin secretion. *Endocrinology* 80: 99 - 108, 1967.

( 62 ) Montague, W. and Taylor, K. W.: The role of the pentose phosphate pathway in insulin secretion in the structure and metabolism of the pancreatic islets. S. Falkmer, B. Hellman and B. Taljedal, editors. Pergamon Press, Ltd., Oxford, 1970. p 263 - 273.

( 63 ) Unger, R. H., and Lefebvre, P. Glucagon physiology.: In *Glucagon Molecular Physiology, clinical and therapeutic Implications*. R. H. Unger and P. Lefebvre editors. Pergamon Press, Inc., Elmsford, N. Y. 1972. pp 213 - 244.

( 64 ) Ohmeda, A., Aguilar - Parado, E. Eisen traub, A. and Unger, R.: Control of pancreatic glucagon secretion by glucose. *Diabetes* 18: 1 - 10, 1969.

( 65 ) Iversen, J.: Secretion of glucagon from the isolated perfused canine pancreas. *J. Clin. Invest.* 50: 2123 - 2136, 1971.

( 66 ) Pagliara, A., Stillings, S., Hover, B. and Matschinsky, F. Regulation of glucagon and insulin secretion by glucose ( G ) and aminoacids ( AA ) in isolated perfused rat pancreas. *Clin. Res.* 22: 847 ( Abstr ), 1973.

( 67 ) Hellman, B., Sehlin, J. and Taljedal, I.: Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 241: 147 - 154, 1971.

( 68 ) Losa, M., Bock, L., Schopohl, J., Stalla, G. K., Muller, O. A. and Von Werder, K.: Growth hormone releasing factor infusion does not sustain elevated GH - levels in normal subjects. *Acta. Endocrinol.* ( Copenh ) 107 : 462

( 69 ) Alba - Roth, J., Muller, A. O., Schopohl, J. and Von Werder, K.: Arginine stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67: 1186 - 1190, 1988.

- ( 70 ) Iverson, J. Secretion of glucagon from the isolated perfused canine pancreas. *J. Clin. Invest.* 50: 2123 - 36, 1971.
- ( 71 ) Weir, G. C., Knowlton, S. D., Atkins, R. F., McKennan, K. X. and Martin, D. B. Glucagon secretion from the perfused pancreas of streptozotocin - treated rats. *Diabetes* 25: 275 - 281, 1972.
- ( 72 ) Samols, E., Tyler, J. M. and Kajinuma, H. Influence of the sulfonamides on pancreatic humoral secretion and evidence for an insulin - glucagon feedback system. In Proceedings of the 7<sup>th</sup> international Diabetes Federation Congress. Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, Series No. 221, 1971, pp 636 - 655.
- ( 73 ) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Parr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the follin phenol reagent., *J. Biol. Chem.*, 193: 265 - 275, 1951.
- ( 74 ) Giles, K. W. and Myers, H. An Improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 206: 93, 1965 .
- ( 75 ) Bernal, A., Méndez, J. D. y Rosado, A. Determinación rápida del peso seco por colorimetría. *Arch. Invest. Méd. ( Méx )* 12 : 33 - 89, 1981.
- ( 76 ) Geyer, W. J. and Dabich, D. Rapid Method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 39: 412 - 417, 1971.
- ( 77 ) CIBA - CORNING. Patent # 231742. Gilford Systems.
- ( 78 ) Wahlefeld, A. W. Methods of Enzymatic Analysis. ( H. U. Bergmeyer ed. ) Academic Press, New York, 1974, 1831.
- ( 79 ) CIBA - CORNING. Patent # 720701. Gilford Systems.
- ( 80 ) Fujimoto, M., Kameji, T. and Kanaya, A. Purification and properties of rat small intestinal arginase. *J. Biochem.*, 79: 441 - 449, 1976.
- ( 81 ) Kanalas, J. J., Spector, E. B. and Cederbaum, S. D.: Hollow - Fiber reactors containing mammalian arginase: an approach to enzyme replacement therapy. *Bioche. Med.* 27 : 46 - 55, 1981.
- ( 82 ) Harri, M. and Hartiala, K : Arginase activity in rat small intestinal mucosa. *Acta. Physiol. Scand.*, 89 : 126 - 128, 1973.
- ( 83 ) Van Eisen, A. and Leroy, G. : Arginase isoenzymes in human diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 52 ( 1 ) : 191 - 198, 1975.



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

( 84 ) Orci, L. : Macro - and Micro - domains in the endocrine pancreas. Diabetes. 31: 538 - 565, 1982.

( 85 ) Taylor, R. and Angius, L. : The biochemistry of diabetes. Review article. Biochem. J. 250: 625 - 640, 1988.