

300627

4
2ej



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

INCORPORADA A LA U. N. A. M.

**"EFECTO DE ARGININA SOBRE LOS NIVELES
PANCREATICOS DE POLIAMINAS"**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARCO ANTONIO ARREOLA INIESTA

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. JOSE DOMINGO MENDEZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1992



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

	<u>Página</u>
1.- INTRODUCCION	4
2.- GENERALIDADES	5
2.1 PANCREAS	5
2.1.1 ACINI	5
2.1.2 ISLOTES DE LANGERHANS	7
2.2 DIABETES HELLITUS	10
2.2.1 Diabetes Mellitus Tipo I	10
2.2.2 Diabetes Mellitus Tipo II	11
2.2.3 Otros Tipos de Diabetes	14
2.2.4 Etiología de la Diabetes Mellitus	16
2.2.5 Tratamiento	17
2.3 ARGININA	18
2.3.1 Arginina y su acción en el Páncreas	20
2.4 POLIAMINAS	25
2.4.1 Biosíntesis de poliaminas	28
2.4.2 Relación de poliaminas en la producción de Insulina y Metabolismo de Carbohidratos	35
2.5 INSULINA	39
2.5.1 Función	39
2.5.2 Biosíntesis de la Insulina	43
3.- MATERIAL Y METODOS	49
4.- RESULTADOS	52
5.- DISCUSION DE RESULTADOS	70
6.- CONCLUSIONES	73
7.- COROLARIO DE METODOS APLICADOS	74
8.- BIBLIOGRAFIA	78

1) INTRODUCCION:

La L-arginina es un aminoácido considerado como semiesencial para los mamíferos y las aves ya que aunque es sintetizado por estos organismos, no lo producen en cantidades adecuadas, por lo que lo tienen que ingerir en la dieta normal, sobre todo en las etapas tempranas del desarrollo principalmente en humanos y ratas, donde no se puede sintetizar la arginina con bastante rapidez como para sostener la síntesis de urea y la síntesis de proteínas.

La importancia de este aminoácido, se debe a que participa en varios procesos bioquímicos, de entre los cuales se encuentra su intervención directa en el metabolismo de carbohidratos, ya que se ha demostrado que este aminoácido estimula la liberación de insulina tanto en humanos como en otros mamíferos como la rata y el conejo.

La ruta que sigue la L-arginina en este proceso es desconocida, por lo que el presente trabajo se desarrollo para poder elucidar dicha ruta y cuya importancia puede derivar en un tratamiento de la diabetes mellitus tipo II con este aminoácido.

Pensamos que es muy posible que la L-arginina sea metabolizada para la formación de poliaminas, que son factores de crecimiento y su presencia es necesaria para la regulación de varios procesos como la división, proliferación y diferenciación celular; las poliaminas más importantes son la putrescina, espermidina y espermina, se encuentran ampliamente distribuidas en los sistemas vivientes y se presentan como bases alifáticas libres o conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos y péptidos.

Además de ser factores de crecimiento las poliaminas también ayudan a la estabilización de membranas celulares y partículas subcelulares, ayudan a la estabilización del DNA para evitar su desnaturalización, ayudan al empacamiento del DNA en bacteriófagos, estimulan la síntesis de DNA y RNA, estabilizando a este último al ser sintetizado.

En cuanto a otras reacciones metabólicas se ha demostrado que las poliaminas estimulan la lipólisis, incrementan la utilización de fructosa en espermatozoides, inhiben la agregación de plaquetas, inhiben a la ATP'asa y modifican o estimulan las actividades de enzimas como proteincinasas, fosforilasa, colincinasa, nucleótido cinasas etc.

También tiene efectos en la síntesis de proteínas ya que ayudan a la fijación de moléculas de tRNA a ribosomas, estimulan la metilación de tRNA, se asocian con los ribosomas, ayudan a la biogénesis de partículas ribosomales e intervienen en la iniciación y fidelidad de la traducción principalmete.

2.- GENERALIDADES:

2.1 PANCREAS:

El páncreas es una glándula compuesta, que se encuentra situada paralelamente al estómago y detrás de él (figura 1), presentando una función secretoria endócrina y exócrina de hormonas necesarias para el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Su estructura comprende dos tipos principales de tejidos: Los acini, responsables de la secreción exócrina y los islotes de Langerhans, responsables de la secreción endócrina; ambos regulan la homeostasis en humanos por acciones opuestas de sus productos de secreción (41).

2.1.1 ACINI: Los acini son grupos de células que secretan enzimas digestivas (figura 1) en forma de jugo pancreático hacia las porciones altas del intestino delgado en respuesta a la presencia del quimo. La composición del jugo pancreático dependerá de la composición y naturaleza del alimento que contenga este.

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

a) Enzimas proteolíticas:

- TRIPSINA
- QUIMOTRIPSINA
- CARBOXIPOLYPEPTIDASA
- RIBONUCLEASA
- DESOXIRIBONUCLEASA
- INHIBIDOR DE TRIPSINA

b) Enzimas digestivas de Carbohidratos:

- AMILASA PANCREATICA

c) Enzimas lipídicas:

- LIPASA PANCREATICA
- ESTERASA DEL COLESTEROL
- FOSFOLIPASA

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

Los iones bicarbonato y el agua son secretados principalmente por las células epiteliales de los conductos de los acini o por células acinares especiales derivadas de los conductillos.

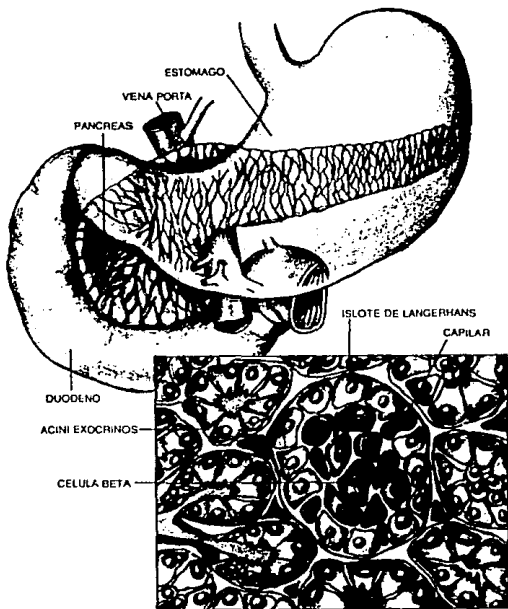


figura 1: El páncreas se aloja debajo del estómago y su función principal es la de la producción de hormonas digestivas que se segrega al intestino por un proceso de secreción exocrina. Dispersos por la glandula se encuentran los islotes de Langerhans (recuadro), que contienen a las células beta, productoras de insulina, la cual se libera directamente a los capilares sanguíneos por un proceso de secreción endocrina.

(40)

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

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

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

La regulación hormonal es la que regula principalmente todo el proceso de la secreción, siendo la hormona clave; la secretina y la colecistocinina, la primera estimula principalmente la secreción pancreática de concentraciones altas de ion bicarbonato (145 meq/l aproximadamente) y la segunda estimula la secreción de hormonas pancreáticas exócrinas; un efecto similar es provocado por la gastrina, hormona secretada en la fase gástrica de la digestión (19).

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

Las células de los islotes de Langerhans en general se caracterizan por presentar un alto grado de compartimentalización, dado por un gran contenido de Reticulo Endoplásmico Rugoso, Aparato de Golgi y Polisomas; también sus mitocondrias son extremadamente pequeñas en comparación con las mitocondrias de otras células, además de contener numerosos cuerpos ceroides autofluorescentes que contienen enzimas lipídicas y lisosomales.

También presentan un sistema de microtubulo-microfilamento, el cual puede ser observado adyacente al plasma de la membrana y distribuido a través del citoplasma; en cultivos de células monocapa se puede observar largas uniones de microtubulos que separan columnas lineares de gránulos beta. Los microfilamentos están presentes como tejido junto de la membrana y probablemente ocurran como fibras individuales en el interior de la célula (19).

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

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

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

Células Alfa: Este tipo de células secretan la hormona llamada glucagon, cuya función es la de aumentar la concentración sanguínea de glucosa, ya que esta hormona provoca el desdoblamiento del glucógeno hepático y muscular e incrementa la gluconeogénesis, lo que aumenta grandemente la disponibilidad de glucosa para los otros organelos del cuerpo. (41).

En el hombre, las células alfa están rodeadas de un saco membranoso y su distribución entre los islotes varía en diferentes especies, por ejemplo en la rata y ratón las células alfa forman un anillo en la periferia del islote, en el hamster y el hombre están distribuidas en el islote y en el caballo se encuentran en el centro del islote. Las células alfa comprenden aproximadamente el 20-25 % de la población de células en el islote de mamíferos adultos (9).

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

Este tipo de células, tienen un alto grado de compartimentalización la cual está dada por los gránulos secretorios o gránulos beta, el aparato de Golgi y el Reticulo Endoplasmico Rugoso; los Gránulos Beta derivan del Reticulo Endoplasmico Rugoso a través del aparato de Golgi, siendo estos Gránulos Beta los que contienen y secretan la insulina. (39)

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

Las células beta, comprenden el 75-80 % de la población celular en los islotes en el páncreas humano (9).

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

Este tipo de células son identificadas por métodos de microscopía electrónica, midiéndose el tamaño de sus gránulos secretores, cuyo tamaño es de 250-450 nm y con opacidad electrónica baja (9).

Células PP: Las células PP son un tipo de células que se encuentran en los islotes en pequeñas cantidades y secretan una hormona llamada polipéptido pancreático cuya función se cree que es la de regular ciertas funciones gastrointestinales, ya que se ha descubierto que regula la liberación de enzimas digestivas pancreáticas (40).

Células C, E y F: Además de las células descritas anteriormente, se han descrito otros tipos de células cuya función aún es desconocida, como las células C, E y F, las cuales también presentan gránulos secretorios, pero en una proporción mucho menor o inclusive nula, como lo es el caso de las células C, que no contienen dichos gránulos, además de tener mitocondrias muy pequeñas y muy poca porción de Reticulo Endoplásmico Rugoso (9).

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

2.2 DIABETES MELLITUS:

La Diabetes Mellitus es una enfermedad crónica, que afecta al metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, por una deficiencia en la secreción de insulina o en la acción de la misma, debido a factores genéticos y/o ambientales; se caracteriza por una hiperglicemia continua y alteraciones arteriales, vasculares, nerviosas y hormonales.

Esta enfermedad se divide en diferentes tipos:

- 1) Tipo I o Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMID)
- 2) Tipo II o Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente (DMNID)
- 3) Otros tipos de Diabetes Mellitus

2.2.1 Diabetes Mellitus Tipo I o Insulino Dependiente (DMID): La DMID comienza principalmente en la infancia o en la adolescencia, aunque puede hacer su aparición clínica a cualquier edad (tabla 1), ya que se ha observado también en la vejez aunque con muy poca frecuencia.

Se inicia rápidamente en edades tempranas debido a una predisposición genética que posiblemente provoca el desarrollo de anticuerpos contra las células beta, o su destrucción por enfermedades virales, o bien una degeneración simple de dichas células (figura 2), ocasionándose con esto una completa insuficiencia de insulina, teniendo que tratarse al paciente con dicha hormona, para lograr una función metabólica normal, por lo que se crea una dependencia total de la insulina, razón por la cual se le llama Diabetes Insulino Dependiente.

En la DMID, los pacientes tienden a estar en o debajo de su peso ideal al inicio de la enfermedad, llegando a perder peso rápidamente; Las personas con DMID presentan poliuria (eliminación excesiva de orina), polidipsia (ingestión excesiva de agua), polifagia (ingestión exagerada de alimentos), pérdida de peso y astenia (decaimiento general); bioquímicamente presentan grandes concentraciones de glucosa sanguínea y eliminación de la misma por la orina, además de cetoacidosis provocada por una alta concentración de cuerpos cetónicos en sangre, que provocan un descenso en el pH en la misma (tabla 1).

También se encuentran altas concentraciones de urea debido a una elevada oxidación de aminoácidos, que se acompaña de un incremento en la gluconeogénesis; además de lo anterior, si esta enfermedad no es controlada puede tener consecuencias graves para los ojos, riñones y vasos sanguíneos, provocándose aún más la disminución de la esperanza de vida del paciente (48,9,27,5,41).

2.2.2 Diabetes Mellitus Tipo II o No Insulino Dependiente (DMNID): La frecuencia de la DMNID es de aproximadamente el 85% de las personas que presentan Diabetes Mellitus y se debe a dos causas principales:

a) Por una resistencia a la acción de la insulina, debido a una interacción anormal entre insulina y los receptores de ésta en las células blanco o por una disminución en el número de estas en dichas células, lo que provoca un decremento en la efectividad de la acción de la insulina en el organismo. (figura 2)

b) También puede deberse a una relativa reducción de la secreción de insulina, causado por una reducción en el número de células beta productoras de esta hormona.

Se presenta muy frecuentemente en individuos de mediana edad y en la vejez (tabla 1), aunque al igual que en la DMID, pueden presentarse casos en edades más tempranas.

La apariencia de los islotes en pacientes con Diabetes tipo II es muy diferente de la de las personas que presentan Diabetes tipo I y de las personas que no presentan algún tipo de Diabetes. Los islotes en un paciente con Diabetes tipo II son generalmente agrandados, con un número incrementado de células beta secretoras de insulina (41).

Este tipo de diabetes es conocida también como insulino independiente, donde las anomalías metabólicas provocadas, como afecciones en vasos capilares, arteriosclerosis, afecciones del riñón, de la visión y del sistema nervioso, son menos severas y más controlables, a diferencia de la DMID; además de que el paciente no desarrolla cetosis. No obstante, un diabético de este tipo puede requerir insulina en etapas más avanzadas para corregir la hiperglicemia. En otros casos menos avanzados, el tratamiento puede ser llevado a cabo con dietas y medicamentos orales, tales como la tolbutamida u otras sulfonilureas (27,48,9).

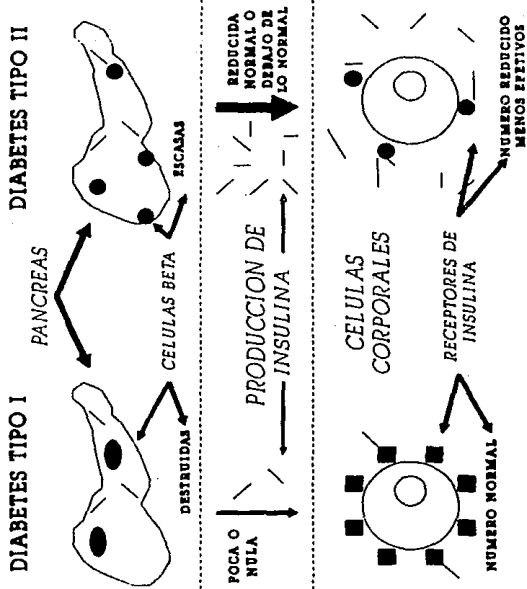
La concentración de insulina en la sangre en estos pacientes puede ser normal, elevada o disminuida. La relación entre la insulina plasmática la concentración de glucosa en los pacientes con DMNID tiene una forma de herradura. Con solo ligeras o moderadas elevaciones de la glucosa sanguínea, la concentración de insulina es elevada, comparada con los niveles en los individuos no diabéticos.

A medida que el grado de hiperglicemia incrementa, los niveles circulantes de insulina en pacientes con diabetes tipo II regresan a valores normales y después pasan a valores subnormales. Algunos investigadores han utilizado la relación entre la insulina circulante y los niveles de glucosa para enfatizar el hecho de que la resistencia a la insulina periférica es el mayor defecto en la Diabetes tipo II. (41)

TABLA 1
 TABLA COMPARATIVA ENTRE LA DIABETES TIPO I Y TIPO II (27)

CARACTERISTICA	DIABETES TIPO I	DIABETES TIPO II
% De personas con diabetes	28 %	88 %
Otros Nombres	Diabetes Insulino dependiente Diabetes Juvenil	Diabetes no Insulino dependiente Diabetes Madura
Edad en la que se Presenta	Antes de los 40 años	Despues de los 40 años
Estado de salud del Paciente	Moderada a Severamente grave	Muestra pocos sintomas
Causas	Escasa o nula Producción de Insulina	Resistencia a la Insulina y relativa o absoluta deficiencia de esta
Niveles de Insulina	Bajo, a pequeñas cantidades	Ligeramente disminuido, Niveles altos
Peso del Paciente	Delgado, tendiendo a perder peso	Presentan sobrepeso generalmente
Complicaciones	Cetoacidosis	Coma Hiperglicemico No hay cetoacidosis
Tratamiento	Insulina, Dietas controladas Ejercicio.	Dietas, Ejercicio, medicamentos orales.

FIGURA 2. FACTORES QUE PRODUCEN LA DIABETES TIPO I Y II (27)



2.2.3 Otros tipos de Diabetes Mellitus: Mientras las personas con niveles anormales de glucosa caen dentro o entre las dos categorías de Diabetes mencionadas anteriormente, existen otros tipos de anomalías que deben de ser mencionadas.

Algunas de estas no son diabetes en sí, pero son estaciones en el desarrollo de la diabetes, estas se clasifican en las siguientes:

a) Riesgo Incrementado para Diabetes: Hay dos categorías que no son diabetes al diagnóstico, pero pueden representar un riesgo alto para un desarrollo posterior de Diabetes mellitus, estas son:

- Anormalidad Previa de Tolerancia de Glucosa (PrevAGT o APTG): Formalmente conocida como prediabetes, esta categoría no presenta evidencia de metabolismo anormal de glucosa, pero presenta una tolerancia a glucosa deteriorada o niveles de glucosa sanguínea elevada, debido o influenciado por tensiones, como en las personas que han tenido elevaciones temporales de los niveles de glucosa sanguínea durante la gestación o enfermedad.

- Anormalidad Potencial de Tolerancia a la Glucosa (PotAGT o APGT): Conocida como Diabetes Potencial o Prediabetes, y se encuentra en aquellas personas que no tienen evidencia de anomalías en glucosa sanguínea, pero que presentan anticuerpos contra islotes o un genotipo idéntico o un familiar que presenta diabetes tipo 1.

b) Tolerancia Alterada a la Glucosa (IGT o TAG): El diagnóstico de la diabetes está basada en elevaciones específicas en los niveles de glucosa sanguínea, generalmente medidos en una prueba de tolerancia a la glucosa (PTG); entre los niveles normales de glucosa y los niveles que son diagnóstico de diabetes, hay una zona intermedia. Las personas que se encuentran en esta zona, se dice que presentan una Tolerancia Alterada a la Glucosa, aunque no presentan los síntomas clásicos de la diabetes, pueden estar en un estado de desarrollo de la misma.

Aunque la diabetes se puede presentar, muchos pueden permanecer en este estado por muchos años, y algunos regresar a estados normales. De cualquier manera, las personas que caen dentro de este grupo deben mantenerse en su peso corporal ideal y atender cualquier síntoma que sugiera diabetes.

c) Diabetes Mellitus Gestacional (GDM o DMG): Las mujeres que presentan este tipo de Diabetes, no presentan evidencia de un metabolismo anormal de glucosa durante la gestación aunque tienen un riesgo incrementado tanto para las complicaciones asociadas con diabetes durante la gestación como para el desarrollo real de diabetes después del parto. Si desarrolla Diabetes puede ser inmediatamente o algunos años después.

d) Diabetes Secundaria: Este tipo de diabetes es debido a algunos procesos que reducen la producción de insulina o incrementa la resistencia de insulina, como por ejemplo, puede ser debido a enfermedad pancreática, a posibles tumores en páncreas, por remoción quirúrgica del páncreas etc. Los pacientes con este tipo de diabetes deben ser tratados de igual manera que los pacientes con diabetes tipo I.

e) Diabetes tipo III: En algunas regiones de los trópicos se presenta un tipo no común de diabetes, que se clasifica como Diabetes tipo III y se le llama diabetes tropical o de desnutrición, y se presenta en áreas donde las personas se alimentan con dietas deficientes en nutrientes esenciales. (27)

2.2.4 Etiología de la Diabetes Mellitus:

Stefan S. Fajans (9) señala las causas principales que provocan la Diabetes Mellitus, y son las siguientes:

A. Anormalidad de la función de las células beta determinada genéticamente (reconocimiento del estímulo- propagación del mensaje - secreción) o por la cantidad de estas células:

1. Respuesta secretoria de insulina retardada y disminuida a los nutrientes (glucosa y aminoácidos).
 - a) Número disminuido de sitios receptores a glucosa o a aminoácidos en células beta.
 - b) Afinidad disminuida de los sitios receptores.
 - c) Respuesta microtubular alterada.
 - d) Intercambio alterado de cationes.
 - e) Anormalidad en los niveles de AMP cíclico.

2. Biosíntesis disminuida de insulina.
3. Anormalidades en la conversión de proinsulina a insulina.
4. Síntesis de insulina normal con poca actividad biológica.
5. Disminución en la replicación de células beta.
6. Susceptibilidad incrementada de las células beta a

factores ambientales unido al sistema HLA.

B. Factores ambientales que alteran la integridad de células beta y su función.

1. Factores infecciosos (virales).
2. Autoinmunidad (insinidad antipancreática mediada por células y antígenos)
3. Obesidad y Gestación.
4. Sistema nervioso autónomo (actividad adrenérgica incrementada)

C. Anormalidades de la acción de la insulina.

1. Insensibilidad a insulina endógena.
 - a) Liberación de insulina con actividad biológica alterada.
 - b) Pocos sitios receptores de insulina.
 - c) Interferencia con la unión de insulina a sus sitios receptores (anticuerpos a receptores de insulina).
 - d) Actividad disminuida de enzimas claves.

D. Anormalidad en la secreción de glucagon.

E. Formación o degradación anormal de la membrana basal.

1. Anormalidad primaria (genética).
2. Anormalidad secundaria (insuficiencia de insulina).

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

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

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

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

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

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

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

Existen diferentes preparaciones comerciales de insulina que varían con respecto a la que se obtiene de la especie animal en cuanto a pureza y solubilidad, también difieren en el tiempo de inicio y duración de su efecto biológico, además de que la mayoría de las preparaciones de insulina contienen impurezas las cuales aumentan la inmunogenicidad de la insulina por lo que hasta ahora no ha sido satisfactorio el resultado del tratamiento por restitución de insulina (27,48).

2.3 ARGININA:

La L-arginina o ácido alfa amino-gama guanidín-valeriano (43), es un aminoácido considerado como semiesencial para los mamíferos y las aves ya que aunque es sintetizado en estos organismos, no se produce en cantidades adecuadas, por lo que se tiene que ingerir en la dieta normal, sobre todo en las etapas tempranas del desarrollo (principalmente en humanos y ratas) donde no se puede sintetizar la arginina con bastante rapidez como para sostener la síntesis de urea (ya que participa activamente en su ciclo) y la síntesis de proteínas.

El metabolismo de la L-arginina ocurre por dos mecanismos que son complementarios, estos son:

- 1) Hidrólisis Enzimática, por medio de la enzima arginasa en el ciclo de la urea, que lleva a la formación de ornitina y urea.
- 2) Desaminación Oxidativa, proceso por el cual se conserva el radical guanidínico y hace posible su utilización en la síntesis de creatina. (43)

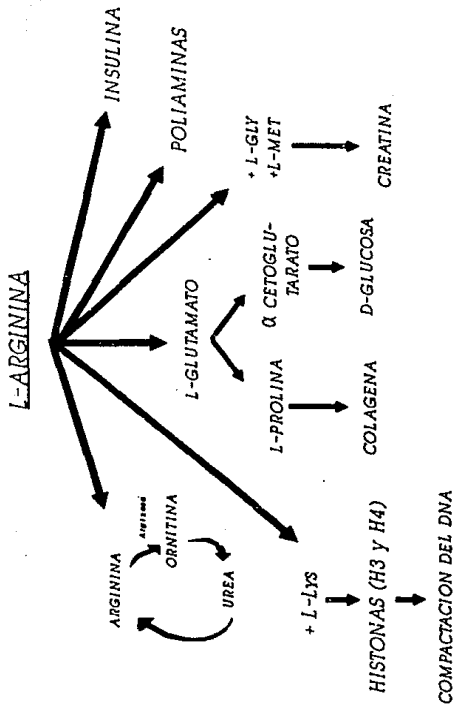
La importancia de este aminoácido se debe a que participa en varios procesos (figura 3) de entre los cuales se encuentran los siguientes:

En primer lugar este aminoácido participa en el ciclo de la urea donde se elimina el amoniaco formado por la desaminación de los aminoácidos, la cual es desechada en la orina. Participa directamente en la formación de tejido conjuntivo al elaborarse a partir de ella L-pro y L-OH pro, aminoácidos importantes para la síntesis de colágena por los fibroblastos en los tejidos. También es un aminoácido glucogénico, es decir que estimula la gluconeogénesis ya que es oxidada a glutamato y este es oxidado a alfa cetoglutarato que es un intermediario de la síntesis de novo de glucosa.

Junto con la L-gli y L-met, la L-arginina participa en la síntesis de creatina, la cual es un compuesto clave para el almacenamiento de grupos fosfato en forma de fosfocreatina en músculo y nervios.

También interviene grandemente en la compactación del DNA ya que este aminoácido forma parte de las histonas y protaminas junto con la lisina, constituyendo ambos aminoácidos la cuarta parte del número total de restos de aminoácidos en las primeras, siendo las histonas H3 y H4 las que presentan la mayor cantidad de arginina. La función de la arginina en las histonas es la de dar una carga positiva a esta proteína a pH neutro para que se pueda combinar con el DNA duplohelicoidal cargado negativamente, dando lugar a complejos DNA-Histona, los cuales como se sabe son una manera de compactar la cadena de DNA en células eucariotes.

FIGURA 3
METABOLISMO DE LA L-ARGININA



También se ha encontrado que la L-arginina interviene en la estimulación de la producción de insulina en páncreas normal y en enfermedades pancreáticas donde hay una función secretoria remanente de las células beta como en la pancreatitis aguda y en diabetes secundaria o en fases iniciales de la diabetes infantil (32,45,29). La respuesta del páncreas a la arginina es dependiente de la edad, siendo menor a medida que avanza esta, como se ha demostrado en estudios realizados con ratas de 2 1/2 y 12 meses de edad (8,46).

Además de intervenir en la estimulación de la producción de insulina, la L-arginina interviene en la biosíntesis de esta hormona, ya que forma parte del péptido C en los residuos número 31,32 y 65 de la cadena primaria de la proteína (figura 12 A) los cuales son los lugares donde ocurre la hidrólisis por tripsinas del péptido, para la liberación de la insulina del péptido C en las últimas fases de la síntesis de insulina (9).

Otro aspecto de la L-arginina es que interviene en la producción de poliaminas como se ha demostrado en estudios realizados con cepas de *E. coli* (4,7), ya que por medio del ciclo de la urea este aminoácido es hidrolizado por la enzima arginasa formando urea y ornitina, este último aminoácido interviene en la producción de poliaminas.

2.3.1 ARGININA Y SU ACCION EN EL PANCREAS: La arginina tiene un papel muy importante en la producción de hormonas endócrinas pancreáticas, ya que se ha demostrado, que este aminoácido estimula en mayor o menor grado a las células A, B y D del páncreas en la liberación de sus respectivas hormonas (14,49,46,10). De entre estos tres tipos de células las que mayor responden a la estimulación con L-arginina son las células beta de los islotes de Langerhans, ya que a concentraciones máximas de 20 mM la liberación de insulina en ratas normales es de 20 ng/ml, en cambio la liberación de glucagon por células alfa al mismo estímulo de arginina es de 3.4 ng/ml (22,41).

Esta concentración de arginina se ha probado para somatostatina, producida por las células delta del páncreas, pero se ha demostrado que a una concentración de 10 mM de arginina, se produce una liberación de somatostatina de 40 pg/ml, una liberación de insulina de 18 ng/ml y una liberación de glucagon de 2 ng/ml (14).

Esta estimulación es dependiente de la dosis administrada (1) y se potencia al utilizarse D-glucosa en un rango de concentración de 3-27 mM (45,48), fructosa a una concentración de 16.7 mM (17) ó potasio 10 mM (14), siendo la cantidad de insulina liberada dependiente de la concentración de arginina administrada como se mencionó anteriormente, este efecto puede observarse en la figura 4.

Se cree que el potasio causa la liberación de la insulina por una despolarización de la membrana plasmática y abriendo los canales de calcio, sensibles a los cambios de voltaje, en presencia de arginina, el potasio estimula la producción de insulina e inhibe la de glucagon, cerrando posiblemente los canales de calcio de las células alfa (7).

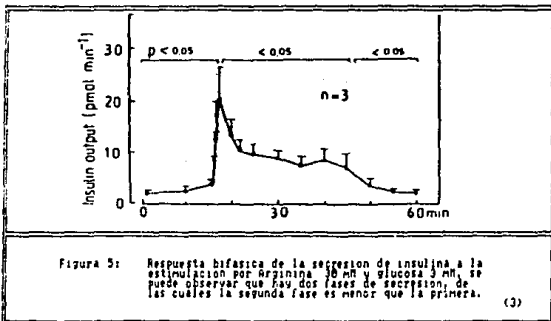
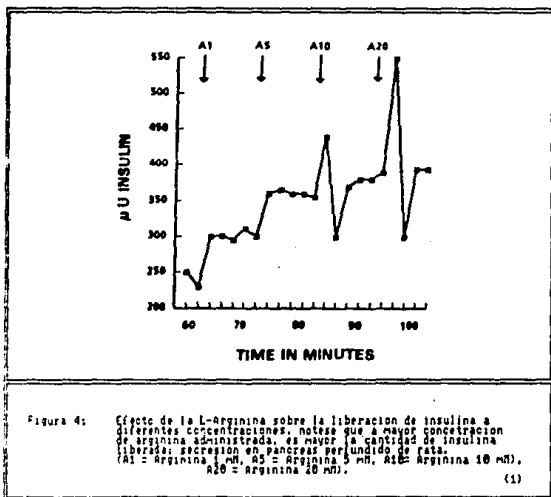
La liberación de la insulina, también está relacionada con el Ca^{2+} . La estimulación de la secreción de insulina por glucosa, sulfonilureas potasio, está asociado con un aumento en el calcio citoplásmico en las células beta pancreáticas, estas acciones están mediadas por la despolarización y flujo del calcio a través de los canales sensibles a los cambios de voltaje. Además el AMFc al parecer sensibiliza la maquinaria secretoria en la señal de calcio. En las células beta, el aumento de calcio inducido por la glucosa, es precedido por una disminución inicial de este catión, lo cual se atribuye a una secuestración intracelular y a un transporte al exterior. Esta reducción en el calcio en la célula beta, provoca una inhibición de la liberación de insulina (23).

La respuesta del páncreas a arginina en el estado diabético junto con una potencialización hiperglicémica se considera como un indicativo de la disminución de la capacidad secretoria de insulina por parte del páncreas. Es muy probable que este aminoácido sea metabolizado dentro de las células beta de los islotes de Langerhans, ya que se ha demostrado que en islotes transplantados a hígado de rata la arginina también los estimula para la producción de insulina. La secreción de insulina estimulada por arginina es de la misma naturaleza que la provocada por glucosa, ya que también es bifásica (3), como puede observarse en la figura 5.

La glucosa 27.7 mM y la arginina 8mM estimularon la secreción de insulina en páncreas de ratas normales. Cuando una infusión inicial de arginina era seguida de una segunda administración del aminoácido aproximadamente a los 50 minutos después de la primera administración, la respuesta de insulina al aminoácido fue mucho menor que en la primera infusión, pero cuando después de la primera infusión de arginina, se administraba una dosis de glucosa 27.7 mM la respuesta de insulina a la segunda administración de arginina fue aproximadamente 6 veces mayor, de acuerdo a lo anterior podemos observar que la glucosa ejerce un efecto primario en la estimulación de la secreción de insulina por arginina en ratas normales.

En las ratas diabéticas, la respuesta secretoria fue disminuida; aunque la respuesta a glucosa fue totalmente disminuida, la respuesta a arginina se conservó, aunque de una manera menor; la relación de respuesta a glucosa y a arginina, fue del 0.01 y 0.29 respectivamente, esta diferencia de relaciones fue significativa.

Estudios *in vitro* sugieren que el efecto de la glucosa sobre la estimulación de la secreción por arginina, puedan involucrar tanto un incremento en la respuesta (V_{max}) y un incremento en la sensibilidad de la célula beta a la arginina, por ejemplo un decremento de la ED50.



Se considera que la potenciación hiperglicémica al estímulo de la arginina, es un indicador de la disminución de la capacidad secretoria del páncreas. Los resultados demuestran que los valores de EDSO para la primera y segunda fase de la secreción de insulina por arginina son significativamente diferentes uno del otro y que la glucosa incrementa la V_{max} de cada fase sin alterar la EDSO.

Se ha encontrado que la arginina sola provoca la secreción de insulina y de glucagón, pero en concentraciones menores la secreción se reduce en un 59 a 79 % de lo que ocurre normalmente cuando es acompañada de glucosa, se cree que la arginina en ausencia de glucosa aumenta el catabolismo endógeno de las dos hormonas como se ha observado en páncreas expuesto a diazóxido y sulfonilureas (3).

La respuesta del páncreas a la arginina, en cuanto a la producción de insulina como se dijo anteriormente es bifásica, la primera fase de secreción de la hormona se presenta a los tres minutos después de la administración del aminoácido y la segunda fase se observa alrededor de los treinta minutos después, como lo demuestran los estudios realizados por Consoil et al (6).

Estudios realizados para medir la concentración de insulina en suero, administrando arginina en diferentes concentraciones han encontrado que para llegar a un máximo de secreción de insulina en la primera fase, se necesitan 0.6 g de arginina, que corresponden a un EDSO, expresado como concentración de arginina en suero, de aproximadamente 0.6 mmol/l. El EDSO para la segunda fase de la secreción de insulina por arginina es de 2.7 ± 0.4 mmol/l en el hombre y 5-6 mmol/l en la rata. La marcada diferencia en la EDSO entre la primera y segunda fase de la liberación de insulina implica que la regulación de las dos fases por arginina, puede involucrar diferentes mecanismos.

El hecho de que la glucosa no altere la EDSO para la arginina, puede involucrar un efecto de reabastecimiento de ATP por parte de la glucosa, el cual es máximo a niveles de glucosa de alrededor de 5 mmol/l

Todo lo anterior nos indica que en el hombre la regulación de las dos fases de secreción de insulina por arginina es diferente, con una alta sensibilidad a arginina para la primera fase que para la segunda. Además de que la hiperglicemia potencializa la secreción de insulina sin alterar significativamente la EDSO de las dos fases de la secreción de insulina por arginina (47)

Esta respuesta de insulina a arginina disminuye con la edad y esto al parecer es independiente del secretagogo utilizado, todo esto está relacionado con la edad del individuo, con la reducción de la actividad de la enzima glicerofosfato deshidrogenasa (46,8) y al avance en la producción del estado diabético, como se menciono anteriormente, aunque no disminuye la producción de glucagón, ni aún en diabéticos (46).

De todas las formas de administración utilizadas (intravenosa, perfusión *in vivo* e *in vitro* y administración intraperitoneal), las que mejores resultados han dado, han sido la técnica de perfusión y la técnica de inyección intravenosa (38).

La arginina no solo causa la liberación de insulina, glucagon somatostatina en el páncreas, sino que también a grandes concentraciones, puede producir grandes daños en el páncreas, sobre todo a concentraciones mayores a los 500 mg/100 mg de peso corporal, entre los daños que puede causar está la desorganización progresiva y degeneración del retículo endoplásmico rugoso de las células acinares y una reducción en el número de zimógenos, lo anterior posiblemente se deba a una acción negativa de la arginina sobre la síntesis de proteínas, interfiriendo con la producción de gránulos de zimógeno, lo cual explica la reducción en su número.

También se han observado daños en diversos organelos como lo son las membranas granulares, las mitocondrias. En el estado final del daño pancreático provocado por grandes cantidades de arginina se observan células acinares necróticas, con signos de daño celular irreversible como lo son la piconosis y la cariorrhexis de su núcleo (26).

Otro efecto de suma importancia en el daño pancreático provocado por un exceso de arginina, es que esta inhibe la síntesis de poliaminas necesarias para un rápido crecimiento de los tejidos, lo cual provoca una inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (33).

2.4 POLIAMINAS:

Las poliaminas son bases aifáticas que presentan dos o más grupos amino, las principales son la espermina, espermidina y la putrescina, cuyas propiedades se presentan en la tabla 2, además de estas, existen otras poliaminas que son menos comunes y que se encuentran en plantas y microorganismos; estas se presentan en la tabla 3.

Las poliaminas son factores de crecimiento y su presencia es necesaria para la regulación de varios procesos como la división, proliferación y diferenciación celular; se encuentran ampliamente distribuidas en los sistemas vivientes y están presentes como bases aifáticas libres o conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos y péptidos.

Además de ser factores de crecimiento las poliaminas también ayudan a la estabilización de membranas celulares y partículas subcelulares, ayudan a la estabilización del DNA para evitar su desnaturalización, ayudan al empaquetamiento del DNA en bacteriófagos, estimulan la síntesis de DNA y RNA y estabilizan al RNA recién sintetizado.

En base a su estructura química, se ha sugerido desde hace mucho que las poliaminas pueden contribuir a la neutralización de la carga negativa de la cadena de DNA ya que a pH fisiológico la putrescina, espermidina y espermina son protonadas, presentando dos, tres y cuatro cargas positivas respectivamente.

Debido a su carga positiva, las poliaminas se unen a ácidos nucleicos y otros compuestos celulares cargados negativamente, por ejemplo la distribución de la carga en la molécula de espermina provoca que esta se una fuertemente a dos grupos fosfato en cada vuelta de la doble hélice del DNA, regulando la abertura del surco formado por las dos hélices (36), como se puede observar en la figura 6. Por lo tanto la espermina estabiliza la doble hélice uniendo sus dos hebras.

Se ha encontrado que las poliaminas causan mayores distorsiones en la forma B usual del DNA, incluyendo transiciones de las formas A y Z, estos cambios en la conformación del DNA pueden tener importantes efectos en las funciones de los ácidos nucleicos como lo es la condensación de la cromatina, la regulación transcripcional y la recombinación del DNA además de la interacción DNA-proteína en la célula (20,12).

Las poliaminas también estabilizan otras estructuras de doble hélice como en las raíces y vueltas presentes en rRNA y mRNA, además de que estabilizan la conformación del tRNA a través de la unión en sitios específicos, estas interacciones pueden ser la base para sus efectos estimulatorios en la síntesis de DNA, RNA y síntesis de proteínas (20).

TABLA 2 , PROPIEDADES DE LAS POLIAMINAS ESPERNINA, ESPERNIDINA PUTRESCINA

NOMBRE	SINONIMOS	FORMULA	PESO MOLECULAR	pH ^a
PUTRESCINA	1,4-diamino-butano	$NH_2(CH_2)_4NH_2$	88.15	8.71
ESPERNIDINA	N-(3-aminopropil)- 1,4-diaminobutano 4-azocano-1,1'- diamino	$NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$	145.25	10.96 9.91 8.51
ESPERMINA	N-N'-bis(3-amino- propil)-1,4- diaminobutano	$NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$	202.34	10.86 10.05 8.82

(35)

TABLA 3 OTRAS POLIAMINAS MENOS COMUNES, ENCONTRADOS PRINCIPALMENTE EN PLANTAS Y BACTERIAS

DIAMINAS	$NH_2(CH_2)_4NH_2$ 1,3 DIAMINOPROPANO $NH_2(CH_2)_3NH_2$ CADAUVERINA	TETRA-AMINAS	$NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$ NORESPERMINA $NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$ TETROSPERMINA $NH_2(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$ CANAVALLINA
TRIAMINAS	$NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$ NORESPERNIDINA $NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$ AMINOPROPILCADAUVERINA $NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$ HONDESPERNIDINA	PENTA-AMINAS	$NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$ CALDOPENTAMINA $NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$ HONDCALDOPENTAMINA

(35)

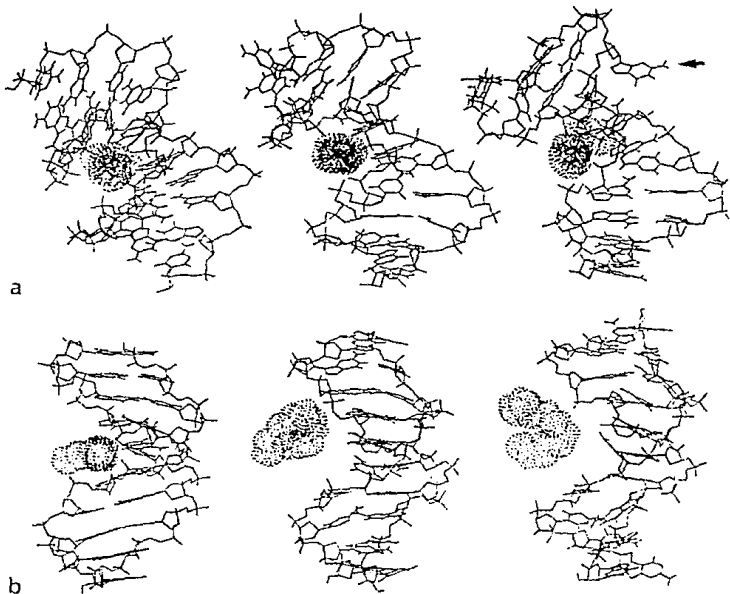


figura (6): Modelos de la dinamica molecular de la interacción espermina-DNA:

- a: Espermina en su mayor unión alternando con polimeros de guanina/citosina $d(GC)^5-d(GC)^5$
 120: Complejo espermina-DNA despues de la minimización de energía; Centro: El complejo despues de 20 ps; DER: El complejo despues de 40 picosegundos. Hay que notar que a este tiempo la espermina permanece en su mayor unión con el DNA y que una de las bases de guanina ha rotado fuera de su arreglo normal en la molecula de DNA. (flecha)
- b: Espermina en su mayor interacción con homopolimeros $d(G)^{10}-d(C)^{10}$. Hay que notar que en este caso la espermina, a diferencia de la figura "a", no permanece en su mayor interacción.

(U)

En cuanto a otras reacciones metabólicas se ha demostrado que las poliaminas estimulan la lipólisis, incrementan la utilización de fructosa en espermatozoides, inhiben la agregación de plaquetas, inhiben a la ATP'asa y modifican o estimulan las actividades de enzimas como proteincinasas, fosforilasa, colincinasa, nucleótido cinasas etc.

También tienen efectos en la síntesis de proteínas ya que ayudan a la fijación de moléculas de tRNA a ribosomas, estimulan la metilación de tRNA, se asocian con los ribosomas, ayudan a la biogénesis de partículas ribosomales e intervienen en la iniciación y fidelidad de la traducción principalmente.

La espermina y putrescina se encuentran comúnmente en todos los organismos eucariontes, generalmente en cantidades del orden de los milimoles. Las concentraciones de las poliaminas varían de acuerdo a la etapa del ciclo de crecimiento celular en el que se encuentre la célula (figura 7) y la inducción de la ornitina descarboxilasa que es una enzima clave en la biosíntesis de poliaminas, es uno de los primeros eventos en la proliferación celular, por lo que las poliaminas intracelulares, generalmente aumentan antes de que incrementen los niveles de DNA, RNA o proteínas.

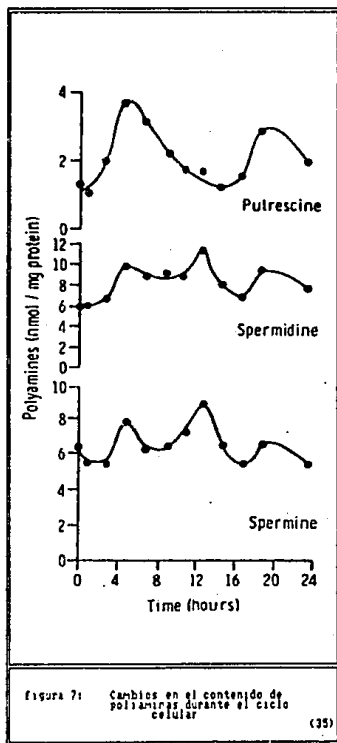
2.4.1 Biosíntesis de las poliaminas: La ruta generalmente conocida para la biosíntesis de poliaminas es la que se presenta en la figura 8.

Se ha sugerido que la arginasa, que es una enzima presente en una mayor concentración por el ciclo de la urea, está presente para asegurar la disponibilidad de la ornitina para la biosíntesis de poliaminas, por lo tanto se considera que la descarboxilación de la arginina por medio de la arginasa es el primer paso para la biosíntesis de poliaminas.

La ornitina está presente en el plasma de donde es tomada y puede ser también formada dentro de la célula a partir de la arginina por medio de la arginasa como se mencionó anteriormente.

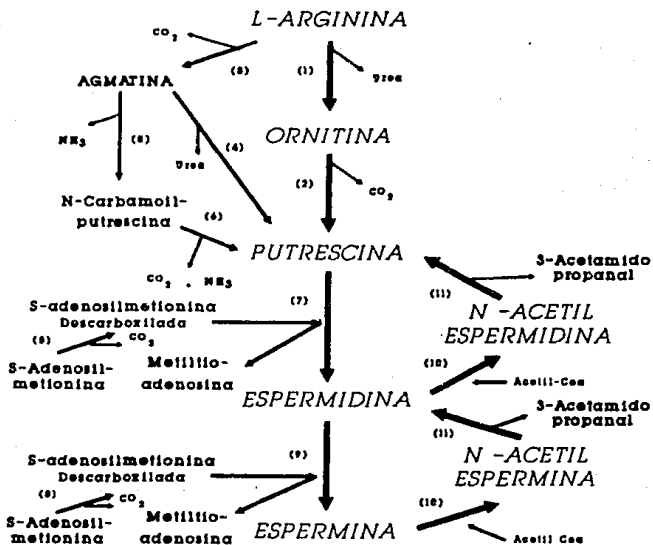
En los mamíferos y otros tipos celulares el paso limitante de la biosíntesis de las poliaminas es la descarboxilación de la ornitina para formar putrescina, paso que es regulado por la enzima ornitina descarboxilasa la actividad de esta enzima aumenta en la fase S de la mitosis sobre todo en linfocitos T (35).

La conversión de ornitina a putrescina está regulada por una gran variedad de estímulos celulares, como el crecimiento celular (35).



BIOSINTESIS E INTERCONVERSION DE POLIAMINAS

Figura 8 (35)



(1) Arginasa

(2) Ornitina Descarboxilasa

(3) Arginina Descarboxilasa

(4) Agmatinasa

(5) Agmatina Delminasa

(6) N-Carbamoylputrescina amidohidrolasa

(7) Espermidina Sintasa

(8) S-Adenosilmetionina Descarboxilasa

(9) Espermina Sintasa

(10) Espermidina/Espermina N-Acetiltransferasa

(11) Poliamina Oxidasa

En un paso común a la mayoría de todos los organismos la espermidina se forma a partir de la putrescina por la adición de un grupo amino donado por la S-adenosilmetionina, reacción catalizada por la aminopropiltransferasa espermidina sintasa. La adición de un segundo grupo aminopropilo a la espermidina forma a la espermina, esta reacción está catalizada por la aminopropiltransferasa espermina sintasa. El grupo donador del grupo aminopropilo es la S-adenosilmetionina que es primero descarboxilada por la S-adenosilmetionina descarboxilasa.

La síntesis de espermidina y espermina es dependiente de la disponibilidad del donador del grupo aminopropilo. Se ha encontrado que en plantas como la *L. sativus*, el compuesto donador del grupo aminopropilo en la biosíntesis de espermidina es el L-aspártico-B-semialdehído.

En las células de los mamíferos la espermina y espermidina pueden ser transformadas de nuevo a putrescina como se muestra en la figura 8, el primer paso es la acetilación de un grupo aminopropilo de la espermina, la reacción es catalizada por la enzima espermidina/espermina N-acetiltransferasa, para dar N-acetilespermina el cual es de nuevo degradado por la poliamina oxidasa para formar espermidina y el aldehído 3 acetamidopropanal, como se muestra en la figura 9.

La espermidina es también acetilada por la misma transferasa la N-acetilespermidina así formada puede ser degradada por la poliamina oxidasa para formar putrescina y acetamidopropanal. La putrescina puede entonces ser reciclada o metabolizada a gama aminobutírico como se muestra en la figura 10.

Las cuatro enzimas que regulan la ruta del metabolismo de las poliaminas son:

- 1) La Arginasa
- 2) La Ornitina Descarboxilasa
- 3) La S-adenosilmetionina Descarboxilasa
- 4) La espermidina/espermina N-acetiltransferasa

1) La arginasa es una enzima que se encuentra abundantemente en el hígado de animales urotélicos y en menores cantidades en el riñón, testículo, bazo, mamas en período de lactancia, etc; en los animales la arginasa se encuentra en la fracción soluble del citoplasma y en diversas estructuras celulares como las mitocondrias, lisosomas, aparato de Golgi y posiblemente en el núcleo de la célula.

El peso molecular de la Arginasa es de 138000 y es estabilizada por diversos cofactores como magnesio, cobalto y níquel; el zinc y algunos aminoácidos básicos como la lisina, ornitina y serina, la desestabilizan; su pH óptimo de acción está entre 9.8 y 10 en presencia de magnesio o cobalto, cuando se hace una mezcla de estos dos iones el pH óptimo es de 8.5 a 9.

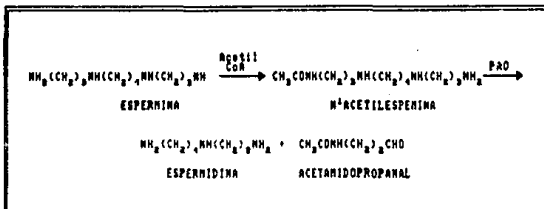


Figura 9 | Conversión de espermina a espermidina por acetilación por la espermina/espermidina N-acetiltransferasa, después oxidación por la poliaminoxidasa (PAO).

(35)

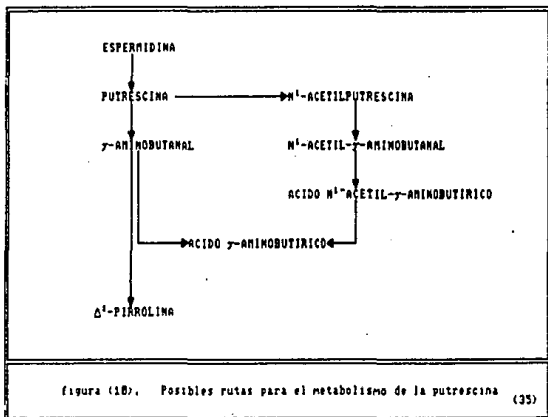


Figura (10). Posibles rutas para el metabolismo de la putrescina

(35)

La actividad de esta enzima depende de la presencia de un cofactor como el magnesio y solo presenta actividad cuando el sustrato presenta un grupo guanidínico con un radical amonio libre y un carboxilo asociado a un grupo amonio o hidroxilo en alfa, además de que tiene que haber cierta separación entre el primero y el segundo; los compuestos que cumplen estas condiciones son la arginina, la canavanina, la cupleína y la monobenzoil arginina.

2) La Ornitina Descarboxilasa (ODC) (L-ornitina carboxi-*liasa*, EC 4.1.1.17) (5), es un dímero cuyo K_m es de 75 μM , requiere piridoxal, y se encuentra tanto en el núcleo como el citoplasma, aunque después de que se induce su acción la mayor parte de la actividad es citoplásmica, representa aproximadamente 1 parte en 6×10^7 de la proteína soluble en el hígado de la rata normal. La inducción de su actividad es al parecer un acompañamiento universal de la estimulación del crecimiento celular, su actividad es reducida en presencia de putrescina y otras poliaminas (35).

La inhibición de la ODC sin la administración de poliaminas, lleva a detener la biosíntesis del DNA y la proliferación celular. La actividad de la ODC puede ser inducida por varios tipos de hormonas y su inducción es asociada con el inicio del crecimiento celular; se ha demostrado que el factor de crecimiento de los nervios, el factor de crecimiento dérmico y la insulina inducen la actividad de una manera directa de la ODC en varios tipos celulares, la acción de esta hormona esta mediada por aminoácidos como la asparagina en concentraciones de 2 a 6 μmol por mg de proteína, sobre todo en la inducción de la actividad de la ODC por la insulina donde se ha descubierto que hay un gran sinergismo entre estas dos sustancias para inducir su actividad, ya que sin este aminoácido la insulina no puede realizar esta acción.

La actividad de la ODC es inducida por un número limitado de aminoácidos que están relacionados por su reactividad primaria con los sistemas de transportes de aminoácido A y N estos, aminoácidos son transportados al interior de la célula por mecanismos transportadores dependientes del sodio (5).

3) La S-adenosil metionina Descarboxilasa del hígado de la rata tiene un K_m de 50 μM , es activada por la presencia de Putrescina, aunque se ha encontrado en estudios realizados con *E coli* que esta enzima es activada por Mg, Ca y Mn, su actividad es inhibida por su producto, la S-adenosilmetionina descarboxilasa y por el metilgloxal bis-guanidilhidrazona, que es un análogo estructural de la espermidina, a diferencia de la Ornitina Descarboxilasa (ODC) no se conoce algún inhibidor específico para esta enzima, la aplicación de poliaminas exógenas lleva a la reducción de la S-adenosil metionina descarboxilasa, y la reducción en la cantidad de poliaminas lleva a un aumento en la biosíntesis de la enzima.

4) La espermidina/espermina N-acetiltransferasa es una enzima citosólica, que se ha aislado del hígado de la rata, cuyo peso molecular (M) es de 115,000, se encuentra formada por dos subunidades de 60,000 cada una, Actúa sobre la espermidina para formar exclusivamente N-acetilespermidina.

La espermina es acetilada para dar N-acetilespermina que puede ser posteriormente acetilada por esta enzima para dar N1, N12-diacetilespermina aunque este compuesto no se ha detectado in vivo. La enzima es altamente específica a un grupo aminopropilo unido a un grupo amino secundario.

La síntesis de esta enzima puede ser inducida por una amplia variedad de estímulos tóxicos, hormonas, poliaminas exógenas y algunos análogos sintéticos así como factores del crecimiento presentes en el suero.

Estas tres últimas enzimas están caracterizadas por su vida media muy corta (del orden de 1 hora o menos) y el incremento en su actividad es dependiente tanto de la biosíntesis de las enzimas, como de la reducción en el rango al cual la enzima es degradada.

Las rutas secundarias o terminales del metabolismo de las poliaminas son desconocidas aunque se han realizado varios intentos para aclarar lo anterior, como por ejemplo se sabe que las "chalonas", que son reguladores específicos del crecimiento de los tejidos, disminuyen a medida que avanza la edad del individuo, esta y otras evidencias indican un posible papel de las poliaminas, lo cual lleva a sugerir que las chalonas pueden ser poliaminas oxidadas que rápida y reversiblemente se unen a proteínas debido a que poseen grupos amino cargados positivamente y un grupo carbonilo en una molécula relativamente pequeña, aunque esto no se ha demostrado plenamente.

El metabolismo incrementado de las poliaminas en los tejidos en crecimiento ha llevado a considerar el uso de poliaminas como marcadores de tumores o como índices de terapias para este mal, aunque esto no se ha podido llevar a la práctica a nivel de clínica debido en parte a problemas metodológicos, además de que la medición de poliaminas en la orina no proporciona indicaciones específicas de la presencia de tumores malignos, aunque recientemente se ha demostrado que en pacientes que han sufrido un trasplante de corazón presentan cambios en las poliaminas urinarias sobre todo en sus derivados acetilados, por lo tanto los derivados acetilados de las poliaminas pueden prevenir situaciones de rechazo.

Otras aplicaciones de las poliaminas es el uso de análogos de esta o inhibidores de su biosíntesis para utilizarse en quimioterapias de cáncer. El descubrimiento de que los productos de oxidación de la espermina o espermidina pueden matar parásitos intraeritrocíticos sin dañar al glóbulo rojo abre nuevas perspectivas para un mayor uso de las poliaminas en el tratamiento de enfermedades. (35)

Al igual que la L-arginina, las poliaminas a concentraciones inapropiadas son citotóxicas, ya que se ha observado que al exponer a células de *E. coli* a altas concentraciones de poliaminas, se inhibe la biosíntesis de proteínas, esto al parecer se debe a que las poliaminas a altas concentraciones reemplazan al ion magnesio en sitios específicos en los ribosomas de las células, provocando que el ribosoma pierda su estructura activa. En *E. Coli* se sabe que tanto la biosíntesis y metabolismo de poliaminas están para prevenir una acumulación intracelular tóxica de estas.

En el caso de células animales no se está muy seguro del papel citotóxico de las poliaminas ya que dichas células presentan una enzima llamada poliamina oxidasa que actúa sobre espermina y espermidina formando acroleína, el cual es un compuesto muy tóxico para las células y enmascara cualquier efecto tóxico de las poliaminas. Las poliaminas son degradadas en las células animales primero por una acetilación seguida de una oxidación.

Una manera muy importante en las células eucariontes de prevenir la sobreproducción de poliaminas es la regulación negativa de la ODC por poliaminas. Un mecanismo adicional de regulación negativa de ODC por poliaminas parece ser a través de la regulación de la estabilidad de la proteína (36).

2.4.2 Relación de las Poliaminas en la producción de Insulina y Metabolismo de Carbohidratos: La incubación de adipocitos de rata con insulina, espermidina o espermina, estimula la conversión de glucosa a CO₂, esto se presenta a concentraciones de poliaminas entre 1-50 uM, aunque no se sabe por que mecanismo se produce esto, se sabe que esto no se debe a la fuerza iónica de estas moléculas (30).

El grupo de Elgavish demostró que estas moléculas estimulaban el transporte de D-glucosa en células ciliadas renales, esto probablemente se debe a la inhibición de la vía Na⁺/H⁺ por espermina estimulando así el mecanismo Simport de D-glucosa y Na⁺. Se ha demostrado recientemente que algunas enzimas de la vía glucolítica como la hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa son activadas grandemente por espermina (24).

Por medio de estudios de respirometría se demostró que la espermina y espermidina son capaces de activar la conversión de D-glucosa a CO₂, siendo la estimulación esencialmente idéntica a la producida por insulina en células intactas. El grupo de Hougaard localizó altas concentraciones de espermidina espermina en células productoras de insulina por medio de fluorescencia citoquímica (48).

La elevada concentración de espermidina en el páncreas y su relación con L-arg es un indicio de que las poliaminas están implicadas en parte con el metabolismo de carbohidratos y lípidos.

En la tabla 4 se muestra la concentración de poliaminas en el páncreas de rata y ratón, según los estudios de Hougaard et al en 1986.

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

Se sabe que las poliaminas son importantes para la biosíntesis de proteínas y para la división celular. Además los sustratos para las transglutaminasas presentes en las células beta han sido postuladas como de gran importancia para la liberación de la hormona. Por lo tanto la estimulación de síntesis de poliaminas por glucosa puede estar relacionada a alguno de estos tres mecanismos.

La glucosa estimula la biosíntesis de poliaminas no solo desde la ornitina, sino también desde la putrescina, por lo tanto es posible que la glucosa afecte la actividad o cantidad tanto de la ornitina descarboxilasa y enzimas que intervengan en la biosíntesis de poliaminas como la S-adenosilmetionil Descarboxilasa, espermidina sintetasa o espermina sintasa. No se sabe si la glucosa ejerce un efecto regulatorio de la biosíntesis de poliaminas de una manera directa o indirecta. Además no se puede excluir que las poliaminas o sus derivados puedan ser liberados de los islotes celulares como mensajeros intracelulares o ciberninas (cybernins).

Lo anterior está soportado por los hallazgos en los experimentos realizados en medios hidrolizados después de 24-72 horas de incubación con concentraciones nanomolares de espermidina y espermina. En tales medios la relación espermidina/espermina fue 3-6 veces mayor que en los islotes.

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

Es por lo tanto posible que en las células productoras de insulina exista la ruta del glutamato descarboxilasa y la ruta de la putrescina para la formación del gama-aminobutirato.

Estudios citoquímicos muestran que la mayoría de las poliaminas están restringidas al citoplasma de las células productoras de insulina, por lo tanto la evidencia señala un papel de la poliaminas en la liberación de insulina mediada por transglutaminasas o como mensajeros intracelulares (21).

Tabla 4: Concentraciones de espermidina y espermina en pancreas total e islotes aislados de rata y raton. (21)					
		n	Espermidina (nmol/mg de prot.)	Espermina (nmol/mg de prot.)	Relacion Espermidina/Espermina
Rata	Islotes	4	12.8 [±] 1.7	20.3 [±] 3.1	0.63 [±] 0.09
	Pancreas Total	3	22.6 [±] 2.4	6.74 [±] 1.6	3.42 [±] 0.44
Raton	Islotes	3	28.1 [±] 5.6	17.2 [±] 6.8	1.75 [±] 0.43
	Pancreas Total	3	22.1 [±] 4.4	3.24 [±] 0.38	7.10 [±] 2.3

La incubación de células adiposas con insulina, espermidina o espermina estimuló la conversión de glucosa a dióxido de carbono e inhibió la lipólisis. Los efectos de las poliaminas fueron observados en un rango de concentración de 1 a 50 μ M. a altas concentraciones de espermina espermidina la oxidación aumentada de glucosa y la lipólisis suprimida fueron esencialmente idénticas a los efectos máximos producidos por insulina. La putrescina no presentó propiedades semejantes a la insulina. el rango de utilización de glucosa no fue incrementado por insulina o espermina cuando la concentración de glucosa fue mayor a 30 mM. Las observaciones anteriores sugieren que en las células adiposas las poliaminas al igual que la insulina inhiben la lipólisis suprimiendo los niveles de AMPc y facilitando el transporte de glucosa.

El mecanismo de acción de las poliaminas respecto a lo anterior es desconocido, pero no parece ser una función de la fuerza iónica de las poliaminas, ya que la putrescina a fuerzas iónicas equivalentes fue inactiva. a bajas concentraciones de glucosa la espermidina y la insulina aumentaron la utilización de glucosa.

Se ha encontrado que las poliaminas pueden influenciar significativamente las membranas biológicas, además de que hay evidencia de que pueden estabilizar las enzimas asociadas con la membrana del retículo endoplásmico rugoso (30)

La biosíntesis de insulina en el páncreas se ha demostrado por los estudios realizados por Jean Morrisset y Ouhida Benrezzak, quienes encontraron que al estimular el páncreas de ratas con caerulina, que es un análogo de la colecistoquinina los niveles de putrescina, espermidina y espermina se incrementaron 319, 63 y 50 % respectivamente a las 12 y 96 horas después del tratamiento, los rangos en el incremento tanto del peso del páncreas como del contenido de DNA fueron correlacionados positivamente con el contenido total de espermidina y espermina; estos datos sugieren que las poliaminas están relacionadas con el crecimiento pancreático.

El contenido de espermina, espermidina y espermina incrementaron progresivamente a medida que la célula atravesaba por la fase G1 de la mitosis. el incremento fue observado primero para la putrescina, lo cual coincidió con los incrementos observados en las proteínas el contenido de RNA, así como con la iniciación de la fase S de la mitosis caracterizada por un incremento en la síntesis de DNA, los cambios en la concentración de espermidina y espermina fueron observados solo cuando la concentración de DNA llegó a su máximo, de acuerdo a lo anterior se puede concluir que las poliaminas juegan un papel muy importante en el crecimiento del páncreas (37).

Se ha demostrado que las poliaminas estimulan el transporte de D-glucosa y la actividad de la ATPasa en las membranas. El efecto en el transporte de glucosa puede ser debido a un efecto directo de las poliaminas en los acarreadores de glucosa de las membranas o puede ser un efecto indirecto en el transporte de glucosa como resultado de la inhibición de los mecanismos de la toma de sodio (11).

2.5 INSULINA.

2.5.1 Función:

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

La insulina tiene efectos en:

- 1) Metabolismo de carbohidratos.
- 2) Metabolismo de proteínas.
- 3) Metabolismo de lípidos.

1) Efecto de insulina en el metabolismo de carbohidratos: Uno de los efectos más importantes de la insulina es el de la absorción de la glucosa en el hígado para almacenarla en forma de glucógeno, el cual es utilizado en tiempos de ayuno para liberar la glucosa al organismo, manteniendo la glucemia.

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

a) Inhibición de la fosforilasa: Lo cual impide la destrucción del glucógeno; la fosforilasa es una enzima que causa el desdoblamiento hepático del glucógeno en glucosa.

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

c) Aumenta la actividad de la fosfofructocinasa y la glucógeno sintetasa, que son enzimas que promueven la síntesis de glucógeno; la primera causa la segunda etapa de fosforilación de la molécula de glucosa y la segunda se encarga de la polimerización de las unidades de glucosa para elaborar el glucógeno.

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

La insulina detiene la gluconeogénesis por inhibición de la actividad y cantidad de las enzimas necesarias para ello, parte de este efecto se debe a que la insulina disminuye la liberación de aminoácidos en tejidos extrahepáticos como el músculo, reduciendo la disponibilidad de los precursores necesarios para la gluconeogénesis (34).

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

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

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

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

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

2) Cuando se utilizan cantidades elevadas de glucosa para energía, se forma un exceso de iones isocitrato por el ciclo del ácido cítrico, que tienen efecto directo en la activación de la acetilcoenzima A carboxilasa, necesaria para iniciar la primera etapa de la síntesis de ácidos grasos que serán utilizados dentro del propio hígado para sintetizar triglicéridos necesarios para la formación de las lipoproteínas y forma común de almacenamiento de grasa.

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

3) La insulina activa a la lipasa de las lipoproteínas del tejido adiposo, que desdobla de nuevo a los triglicéridos convirtiéndolos en ácidos grasos, este fenómeno es indispensable para que las células adiposas absorban a los ácidos grasos y los puedan almacenar de nuevo en forma de triglicéridos.

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

- La insulina inhibe la acción de la lipasa hormonosensible, enzima que causa la hidrólisis de los triglicéridos en las células de grasa, inhibiéndose por lo tanto la liberación de ácidos grasos a la sangre.

- La insulina promueve el transporte de glucosa al interior de las células de grasa de la misma forma que en las células musculares. Parte de esta glucosa se utiliza para la síntesis de ácidos grasos.

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

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

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

a) La insulina causa el transporte activo de muchos aminoácidos al interior de las células. Los aminoácidos que pasan con mayor intensidad, son: la valina, leucina, isoleucina, tirosina fenilalanina. En consecuencia, la insulina comparte con la hormona del crecimiento la capacidad de aumentar la captación de aminoácidos por las células.

b) La insulina actúa en la síntesis de proteínas incrementando la entrega de energía para dicha síntesis, además de que tiene efecto directo en los ribosomas ya que se ha encontrado que la insulina ayuda a aumentar el número de estos en la síntesis de proteínas, además de que mejora la unión de los ribosomas al m-RNA (34) aumentando la eficiencia de la traducción.

c) Durante un período prolongado la insulina también aumenta la transcripción del DNA en los núcleos celulares, formando así, mayores cantidades de RNA. Incrementa la formación de nuevo de DNA e incluso la reproducción de la célula. Todos estos efectos, promueven aún más la síntesis de proteínas.

d) La insulina también inhibe el catabolismo de las proteínas y por lo tanto la liberación de aminoácidos de las células, sobre todo de aminoácidos glucogénicos. Posiblemente este hecho depende de cierta capacidad de la insulina para disminuir la degradación normal de proteínas por los lisosomas.

La mayoría de los aminoácidos gluconeogénicos liberados de la destrucción de las proteínas, como un resultado de una insuficiencia de insulina y una diabetes no controlada, entran a la ruta de la gluconeogénesis vía piruvato., el piruvato es transformado a fosfoenolpiruvato por la acción secuencial de las enzimas piruvato carboxilasa (PC) y fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK), que son dos enzimas claves en la regulación de la gluconeogénesis. Las actividades de estas dos enzimas se incrementan en la diabetes. Se ha demostrado que la insulina reduce la actividad de estas enzimas en el hígado, pero solo en un 10 % (34).

La deficiencia de insulina no produce una elevación en la actividad de estas enzimas, pero se sabe que los glucocorticoides inducen grandes incrementos en la actividad de la PEPCK (34).

En un estado diabético hay un catabolismo aumentado de proteínas y síntesis disminuida de estas, una actividad incrementada de la glucosa-6-fosfatasa y fructosa-1,6-difosfatasa (34)

Estudios realizados con glicerol marcado demuestran que la insulina cambia la dirección de utilización del glicerol marcado, de síntesis de glucosa a síntesis de proteínas. La ruta PC-PEPCK no participa en la transferencia del carbono marcado del glicerol en la ruta de la gluconeogénesis ni en la ruta de la biosíntesis de proteínas. Lo anterior nos prueba que la insulina controla la gluconeogénesis estimulando la síntesis de proteínas (34).

El efecto inmediato de la insulina en el bloqueo de la gluconeogénesis es el de dirigir el flujo de sustrato, como lo son los aminoácidos gluconeogénicos, a través de la síntesis de proteínas y no el de bloquear la actividad de la PC y la PEPCK. (34)

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

Por lo tanto la insulina fomenta la formación de proteínas y también impide su degradación, lo cual ayuda grandemente al crecimiento del organismo; al parecer la hormona del crecimiento y la insulina funciona de manera sinérgica para promover este, realizando cada una su función específica por separado.

2.5.2 Biosíntesis de la Insulina:

La insulina es una proteína compuesta por dos cadenas de aminoácidos, llamadas A y B (figura 11), conectadas entre sí por enlaces disulfuro, con estructura terciaria y cuya ruptura provoca que se pierda la actividad funcional de esta hormona.

La insulina, es producida por las células beta de los islotes de Langerhans a partir de la preproinsulina, por un mecanismo de síntesis de proteínas ordinario, el cual comienza en el núcleo, con la activación de un gen presente en el DNA, que determina la composición de la preproinsulina, transcribiéndose en la banda de otro ácido nucleico, el RNA que origina y procesa a su vez el RNAm, que se exporta al citoplasma celular, sirviendo como molde para la síntesis de la proteína en los ribosomas, los cuales son organelos encargados de unir los aminoácidos, que van a formar parte de las proteínas, siguiendo una secuencia establecida por el RNAm (figura 13).

Los ribosomas que producen la preproinsulina se encuentran anclados en el exterior de una red compleja de sacos aplanados que se distribuyen por el citoplasma, los cuales se van englobando unos en otros de tal manera que la red se transforma en una bolsa llena de circunvalaciones, a este complejo se le llama Reticulo Endoplásmico, y en la zona de este retículo donde se encuentran los ribosomas, se le llama Reticulo Endoplásmico Rugoso.

Al ser sintetizada la preproinsulina en esta zona, la proteína pasa desde el ribosoma, a través de la membrana del RER (5). La preproinsulina, tiene un fuerte carácter hidrofóbico dado por las extensiones N-terminales las cuales se piensa promueven la asociación de los ribosomas con la membrana del retículo endoplásmico, lo que lleva a una descarga vectorial a través de la membrana dentro del espacio de la cisterna del retículo endoplásmico (9).

En cuanto ésta alcanza el lumen o porción interior del RER (figura 13), la presecuencia es degradada por proteasas sintetizadas también por los ribosomas, quedando proinsulina, como lo demuestran estudios realizados con métodos autorradiográficos, ya que se ha encontrado que transcurridos cinco minutos después del marcaje con aminoácidos radioactivos, la mayoría de las moléculas radioactivas se encuentran en el RER; por cromatografía se puede observar que la molécula predominante es la proinsulina, esto indica que la preproinsulina se rompe apenas se ha formado, dando lugar a la proinsulina.

La hidrólisis enzimática de la preproinsulina deja en el interior del RER a la proinsulina, que es una molécula que agrupa las cadenas de aminoácidas de la insulina A y B, y un péptido de unión llamado péptido C, que engarza el final de una cadena con el principio de la otra, este péptido se separa de la molécula original formándose la insulina (5).

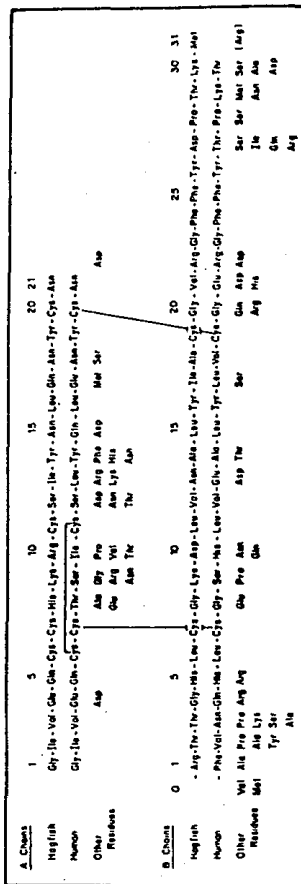
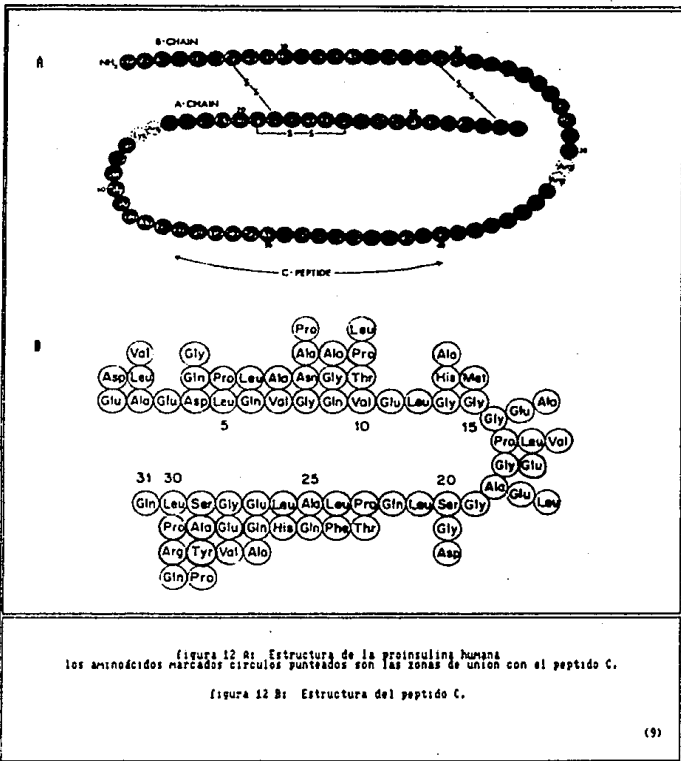


FIGURA II. Estructura de la insulina humana (9)

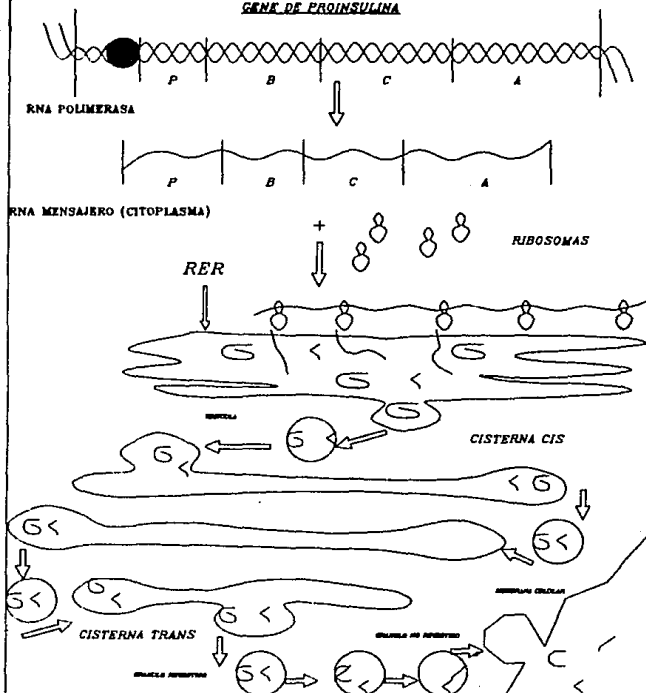


(9)

BIOSINTESIS DE INSULINA

Figura 3, (9,40)

GENE DE PROINSULINA



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

Al realizarse todos estos pasos y la síntesis de otras proteínas como son algunas proteasas, va a haber un flujo uniforme de pequeñas vesículas procedentes del retículo endoplásmico, portadoras de una gran variedad de todas estas proteínas de síntesis reciente hacia los sáculos del aparato de Golgi (figura 13) en un proceso que requiere de aproximadamente de 20 minutos (9).

El aparato de Golgi presenta dos tipos de gránulos: Los gránulos de secreción recubiertos, que tienen una capa de filamentos que recubre su membrana externa, los cuales están formados de una proteína llamada "clatrina", que está relacionada con movimientos de la membrana sobre todo con la gemación de fragmentos de membrana.

El segundo tipo de gránulos, que son los más abundantes y se encuentran dispersos por todo el citoplasma de la célula beta, son los gránulos "no recubiertos", llamados así porque no presentan la capa de clatrina y provienen de los gránulos cubiertos, estos gránulos dan lugar a los llamados gránulos beta.

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

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

Por medio de mediciones con autorradiografía y técnicas de microscopía electrónica se ha descubierto que la transformación de proinsulina en insulina se realiza específicamente en los gránulos de secreción recubiertos del aparato de Golgi (5). La transformación de proinsulina a insulina se comporta como una reacción de primer orden y se lleva aproximadamente en una hora por un tipo de tripsina y por una carboxipeptidasa la cual es necesaria para remover los residuos C-terminales resultantes de la ruptura por la tripsina (9).

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

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

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

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

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

Conforme el gránulo secretor llega al límite celular, la membrana del sáculo se fusiona con la membrana celular, rodeada de capilares que llegan al torrente sanguíneo, en estos capilares se secreta la insulina liberándola a la sangre, a este proceso se le llama amiocitosis (39).

Esta hormona es liberada al torrente sanguíneo provocado por un aumento en la glicemia, la liberación de la hormona se acompaña junto con una liberación de Zn, cuya función es la de acompañar las moléculas de insulina formando un hexámero osmóticamente inactivo y una forma cristalina bioquímicamente estable (9); para iniciar sus efectos sobre las células blanco, la insulina se fija en proteínas receptoras de la membrana, activando al receptor que inicia los efectos de la insulina (los mecanismos de este efecto aún son desconocidos). Pero lo que sí se sabe es que los receptores activados excitan al sistema de AMP cíclico, el cual se piensa es un segundo mensajero para fomentar algunos de los efectos de la insulina (40).

9) MATERIAL Y METODOS:

MATERIAL BIOLÓGICO:

Para la realización de los experimentos se utilizaron 40 ratas Long Evans de 290 - 360 g de peso, las cuales se dividieron en cuatro grupos de diez cada uno, los páncreas otenidos de estas ratas tuvieron un peso promedio de 1.2721 +/- 0.2085 g.

MATERIAL QUÍMICO y APARATOS ANALÍTICOS:

Se utilizaron los reactivos necesarios para la determinación de arginasa, proteínas, peso seco, urea basal, glucosa en suero y poliaminas (ver corolario de técnicas).

Para la cuantificación de poliaminas se utilizó un aparato de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) marca Waters Associates Inc (14), con una columna C-18, con un tamaño de partícula de 10 micras, # de catálogo 50334, de la marca Merck .

Para la lectura de las técnicas colorimétricas aplicadas, se utilizó un colorímetro de la marca Science Essentials, modelo P-1.

METODO:

Se formaron los siguientes grupos de ratas:

- GRUPO 1) RATA NORMAL CONTROL
- GRUPO 2) RATA NORMAL TRATADA CON SOLUCION DE ARGININA Y GLUCOSA
- GRUPO 3) RATA DIABETICA CONTROL
- GRUPO 4) RATA DIABETICA TRATADA CON SOLUCION DE ARGININA Y GLUCOSA

La diabetes en los grupos 2 y 4 se indujo inyectando aloxana a una concentración de 120 mg/kg de peso disuelta en solución salina.

+ Al grupo 1 se le administró por vía intraperitoneal solución salina, la misma utilizada para disolver la L-arginina y la D-glucosa.

+ Al grupo 2 se le administró por vía intraperitoneal 1 ml de una solución de L-arginina 10 mM y glucosa 3.3 mM.

+ Al grupo 3 se le administró por vía intraperitoneal solución salina, la misma utilizada para disolver la L-arginina y la D-glucosa.

+ Al grupo 4 se le administró por vía intraperitoneal 1 ml de una solución de L-arginina 10 mM y glucosa 3.3 mM.

Después de un periodo de 20 minutos (5,21) se procedió a anestésiar a las ratas utilizando quetalar y droperidol, para extraer sangre via bifurcación de la aorta y páncreas.

La sangre fue recolectada en tubos de ensaye y se dejó coagular aproximadamente unos 20 minutos, después de este tiempo se procedió a centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos para separar el coágulo del suero, después de los 15 minutos se detuvo la centrifugación y se colectaron las muestras de suero para la cuantificación inmediata de glucosa.

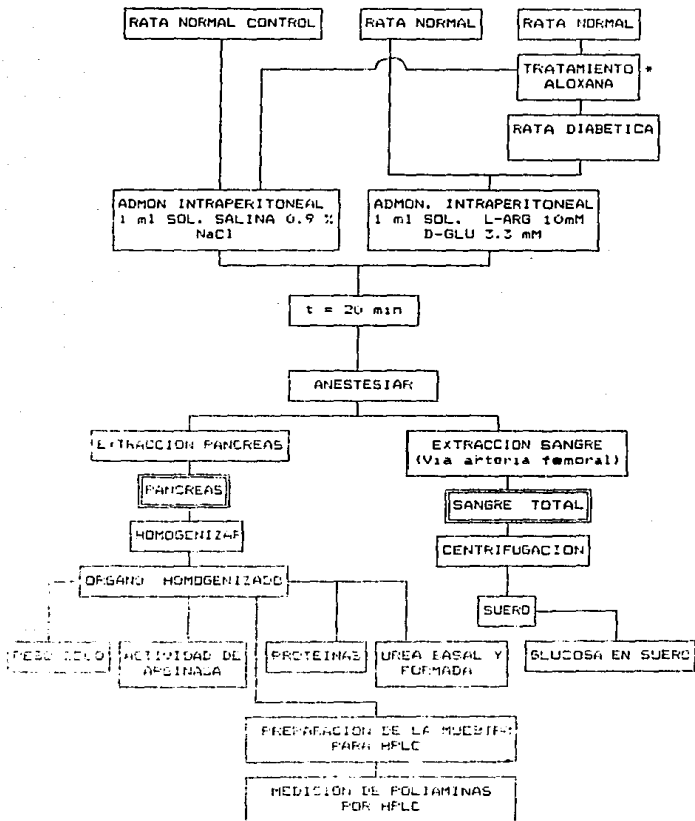
Las muestras de páncreas fueron recolectadas en solución salina al 0.9% con el objeto de lavar a la glándula y eliminar todo resto de sangre posible, posteriormente se procedió a eliminar el exceso de agua colocando a la glándula sobre un papel filtro, acto seguido se procedió a pesar el órgano

Los páncreas así tratados fueron entonces homogenizados en solución salina al 0.9% , y a cada homogenizado se le realizaron las siguientes determinaciones:

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1) PESO SECO | 4) UREA BASAL |
| 2) ACTIVIDAD DE ARGINASA | 5) GLUCOSA EN SUERO (METODO GOD-PAP) (MERK) |
| 3) PROTEINAS (METODO DE LOWRY) | |
| | 6) CUANTIFICACION DE POLIAMINAS POR HPLC |

En la figura 14 se presentan los pasos realizados para el tratamiento de las muestras

figura 14: DIAGRAMA DE FLUJO



* aloxana 120 mg/kg de peso

4) **RESULTADOS:**

En las figuras 14 a 22 se presentan los espectros de los estándares de las poliaminas y las muestras de cada grupo más representativos.

En la tabla 5 y figura 23, se presentan los resultados de glucosa en suero de rata, de todos los grupos.

En la tabla 6 y figura 24, se presentan los valores de la cantidad de proteínas presentes en el páncreas de los animales estudiados.

La tabla 7 y figura 25 presentan los valores obtenidos con la medición de actividad de arginasa.

Los resultados de la determinación de la urea basal están escritos en la tabla 8 y figura 26.

Así mismo se pueden observar los resultados de la cuantificación de poliaminas por HPLC en la tabla 9 y en las figuras 27 a 30.

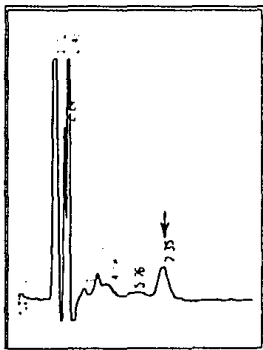


Figura 15
ESTANDAR DE ESPERMINA

CONC. = 788 pmol/ml

TR = 7.35 min

AREA = 482378

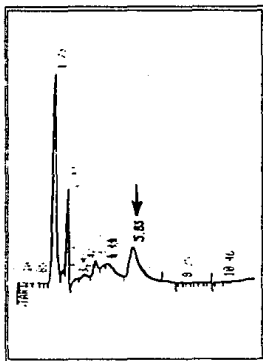
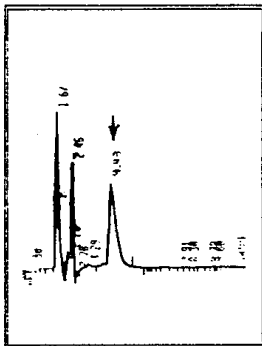


Figura 16
ESTANDAR DE ESPERMIDINA

CONC. = 788 pmol/ml

TR = 5.83 min

AREA = 1475188

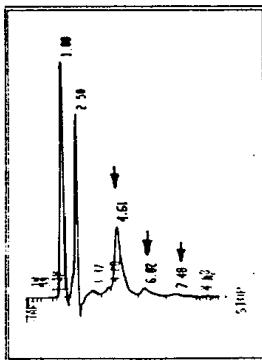


ESTÁNDAR DE PUTRESCINA

CONC. = 700 µmol/ml

TR = 4.48 min

AREA = 2519388



MEZCLA DE POLIAMINAS

CONC. = 700 µmol/ml

TR PUTRESCINA = 4.61 min

TR ESPERMIDINA = 6.82 min

TR ESPERMINA = 7.48 min

ESPECTROS MAS REPRESENTATIVOS DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS POR HPLC
 FASE MOVIL: ME:AL 40 X 40 AGUA
 FASE ESTACIONARIA: COLUMNA C 18

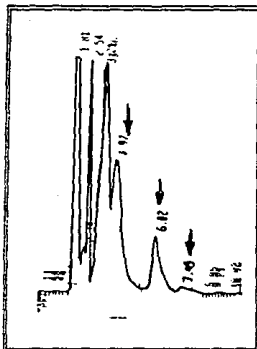


figura 19
 GRUPO 1

PUTRESCINA, TR = 3.97 min
 AREA = 2857888
 ESPENMIDINA, TR = 6.82 min
 AREA = 1684788
 ESPENMINA, TR = 7.49 min
 AREA = 181718

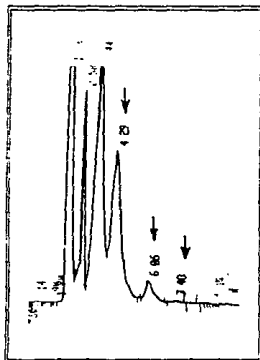


figura 20
 GRUPO 2

PUTRESCINA, TR = 4.29
 AREA = 476288
 ESPENMIDINA, TR = 6.86
 AREA = 522348
 ESPENMINA, TR = 7.48
 AREA = 45237

ESPECTROS MAS REPRESENTATIVOS DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS POR NPLC
 Fase móvil: 10% MeOH en agua
 Fase estacionaria: columna C 18

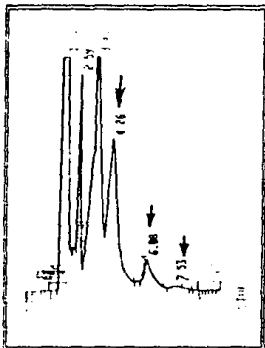


figura 21
 GRUPO 3

PUTRESCINA, TR = 4.26 min
 AREA = 4544088

ESPERRIDINA, TR = 6.08 min
 AREA = 733648

ESPERMINA, TR = 7.53 min
 AREA = 71545

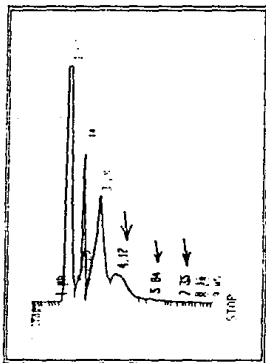


figura 22
 GRUPO 4

PUTRESCINA, TR = 4.12
 AREA = 1331988

ESPERRIDINA, TR = 5.84
 AREA = 68255

ESPERMINA, TR = 7.35
 AREA = 1882

" VALORES DE GLUCOSA EN SUERO "
(mg/dl)

GRUPO	n	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS
1	10	163.05	± 43.66	G1 - G3 G2 - G3 Diferencia G1 - G4 significa- tiva
2	10	181.79	± 36.01	G2 - G4
3	10	246.22	± 67.21	G1 - G2 Diferencia G3 - G4 no signif cativa
4	10	290.23	± 98.68	

Tabla 5

GLUCOSA EN SUERO mg/dl

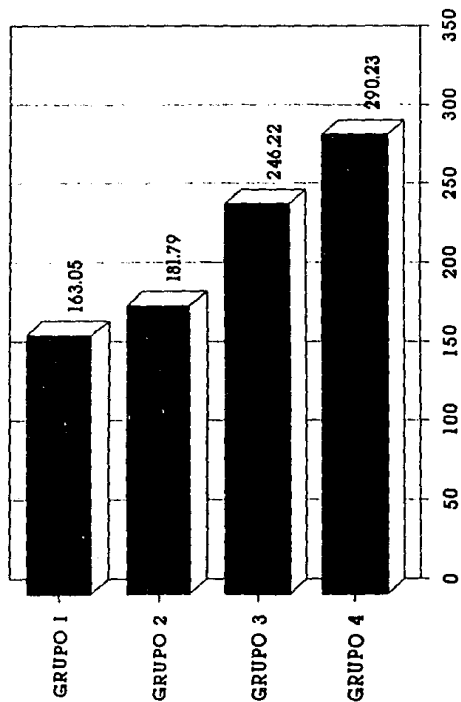


figura 23

"RELACION PROTEINAS/PESO SECO"
(mg prot/mg peso seco)

GRUPO	n	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS
1	10	0.4209	± 0.1435	G1 - G4 Diferencia G2 - G4 significa- tiva G3 - G4
2	10	0.4610	± 0.1336	
3	10	0.4214	± 0.1594	G1 - G2 Diferencia G1 - G3 no signifi- cativa G2 - G3
4	10	0.7071	± 0.0969	

Tabla 6

RELACION PROTEINA/PESO SECO

mg proteína/mg peso seco

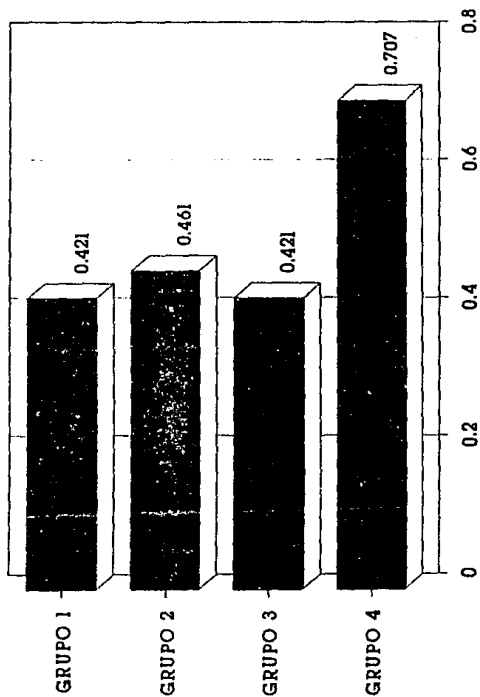


figura 24

ACTIVIDAD DE ARGINASA

nmol urea/(mg prot.·min)

GRUPO	n	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS
1	10	78.47	± 16.09	G1 - G2 Diferencia G2 - G3 significativa G2 - G4
2	10	149.52	± 79.95	
3	10	65.46	± 16.49	G1 - G3 Diferencia G1 - G4 no significativa G3 - G4
4	10	89.27	± 37.63	

Tabla 7

ACTIVIDAD DE ARGINASA

nmol urea/mg proteína*min

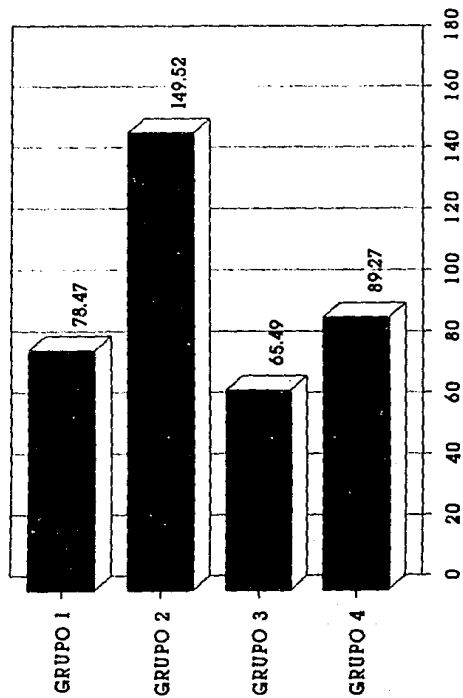


figura 25

'UREA BASAL'
pmol urea/mg prot.

GRUPO	n	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS
1	10	0.0	0.0	G1 - G2 Diferencia G2 - G3 significativa G3 - G4 G2 - G4 G1 - G4
2	10	16.12	± 6.82	
3	10	0.0	0.0	G1 - G3 Diferencia no significativa
4	10	10.06	± 3.50	

Tabla 8

UREA BASAL

pmol urea/mg proteína

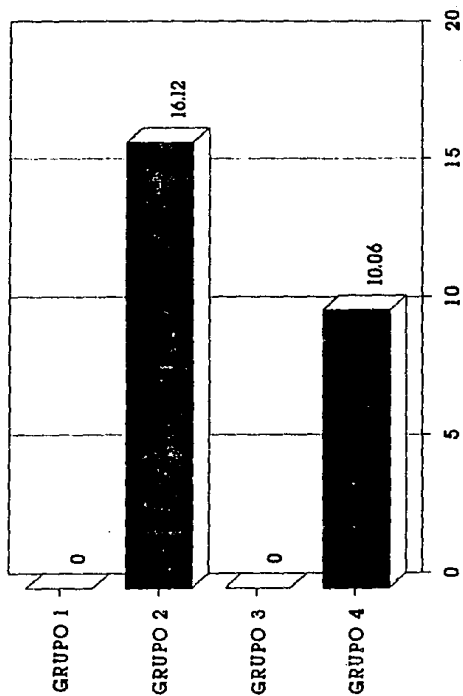


Figura 26

"POLIAMINAS EN PANCREAS"

nmol/mg prot

GRUPO	n	POLIAMINA	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS
1	3	Putrescina	1.2304	± 0.3589	- Putrescina
		Espermidina	1.3101	± 0.4515	
		Espermina	0.0853	± 0.0294	
2	3	Putrescina	1.8420	± 0.3313	- Espermidina
		Espermidina	0.6803	± 0.2352	
		Espermina	0.0582	± 0.0317	
3	3	Putrescina	1.1111	± 0.9021	- Espermina
		Espermidina	0.4419	± 0.4386	
		Espermina	0.0420		
4	3	Putrescina	1.2522	± 0.5283	NO HAY DIFERENCIA
		Espermidina	0.0467	± 0.0383	
		Espermina	0.0189	± 0.0083	

Tabla 9

NIVELES DE POLIAMINAS EN PANCREAS (nmol/mg prot)

GRUPOS:

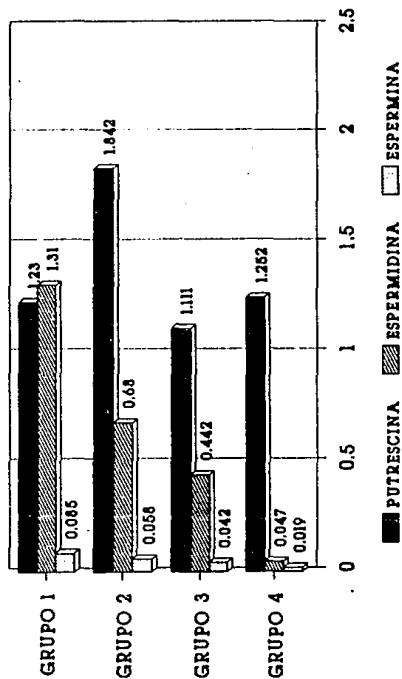


figura 30

NIVELES DE POLIAMINAS EN PANCREAS (nmol/mg prot)

GRUPOS:

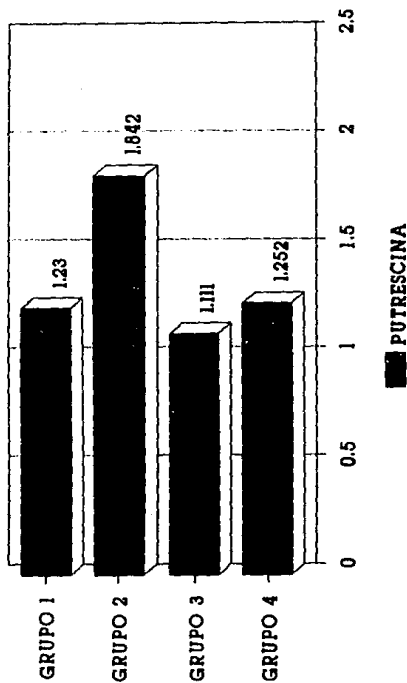


figura 30

NIVELES DE POLIAMINAS EN PANCREAS (nmol/mg prot)

GRUPOS:

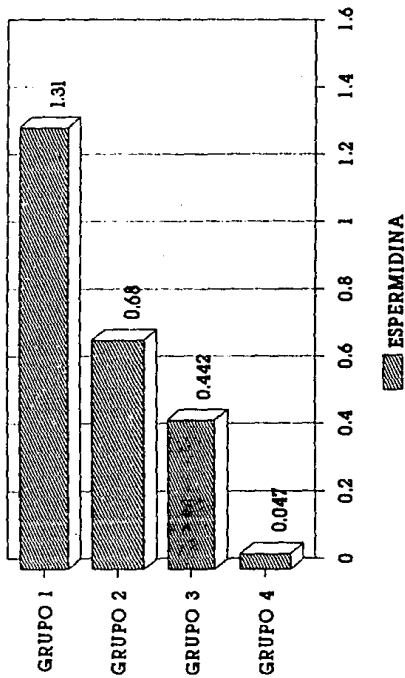


figura 30

NIVELES DE POLIAMINAS EN PANCREAS (nmol/mg prot)

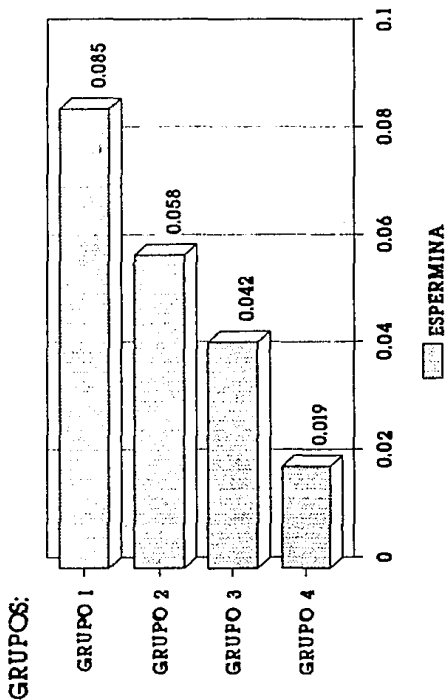


figura 30

5) DISCUSION DE RESULTADOS:

Como se puede observar en la tabla 5 hay una diferencia significativa entre las medias de los valores grupos 1 - 3, 2 - 3, 1 - 4 y 2 - 4, lo cual nos corrobora el estado diabético de los grupos 3 y 4; aunque las diferencias entre los grupos control, con sus respectivos grupos tratados con L-arginina no son significativas, se puede apreciar un ligero aumento de la glucosa en suero en estos últimos, lo cual puede ser debido a que en la solución de L-arginina también hubo glucosa en una concentración de 3.3 mM.

Otra posible explicación para esto es que la administración de L-arginina eleva ligeramente los valores de glucosa en suero, como se ha demostrado en estudios realizados por Menchini et al (32), quienes estudiaron la respuesta del péptido C a la estimulación por arginina en niños diabéticos, encontrando que al administrar L-arginina por vía intravenosa los niveles de glucosa en sangre aumentaron de 75 +/- 6 mg/dl a 100 +/- 9 mg/dl después de 30 minutos, posteriormente a los 60 minutos los niveles de glucosa regresaron al valor inicial; Lo anterior no solo se ha observado en este estudio, sino que también ha sido observado por otros investigadores como Solomon (45), van Haften (47) y Nogoski (38).

En cuanto a los resultados obtenidos en la determinación de proteínas podemos observar una diferencia significativa de medias entre los grupos 1-4, 2-4 y 3-4, y una diferencia no significativa entre los grupos 1-2, 1-3 y 2-3.

Podemos ver que el grupo 4 es el que presenta la mayor cantidad de proteínas, comparándolo con los demás grupos, lo cual nos da un indicio del daño pancreático, lo anterior se puede explicar si recordamos que el grupo 4 es el grupo de ratas diabéticas tratadas con arginina, por lo que podemos decir que al administrar un aminoácido semiesencial como lo es la L-arginina en un organismo con un estado patológico como la diabetes, en la que hay un daño directo sobre el tejido pancreático, este va a tender a recobrar y sustituir el tejido dañado, aumentando la síntesis de proteínas, incluyendo a la insulina. También podemos decir que este aminoácido puede ser un aminoácido limitante para la producción de proteínas pancreáticas ya que en los dos grupos tratados con L-arginina los niveles de proteínas aumentaron aunque en el grupo 2 el aumento no fue significativo comparado con el grupo 1 control.

En cuanto al grupo 3 de animales diabéticos, vemos que no tiene diferencia significativa alguna con el grupo 1 control, de hecho los valores son prácticamente iguales, se esperaba para el grupo 3 un valor disminuido de proteínas, posiblemente esto se deba al corto tiempo de la manifestación de la diabetes en la rata (96 horas) por lo que algún cambio en la deficiencia de producción de proteínas todavía no es muy evidente a este tiempo; también es posible que en el grupo 3 efectivamente la síntesis de proteínas esté alterada, y se encuentre en un proceso de síntesis incrementada para mantener la homeostasis, por lo que no se presenta un efecto notorio dañino durante la diabetes.

Para la actividad de Arginasa obtuvimos una diferencia significativa entre los grupos 1-2, 2-3 y 2-4 . esto nos indica que el tratamiento fue efectivo en el sentido de que el aminoácido se metaboliza en los dos grupos tratados, lo anterior se corrobora también con los datos de urea basal, donde los valores de urea se incrementan desde cero, hasta valores cercanos a los 11 pmol/mg de proteína en los grupos tratados con el aminoácido.

Se puede observar una ligera disminución no significativa en el grupo 3 comparado con el grupo 1, esta pequeña disminución puede estar relacionada con el estado patológico del páncreas, ya que el grupo 3 es el grupo diabético control.

El grupo 4 hay un ligero incremento en la actividad de arginasa, no significativo también, comparado con el grupo 1 y que contrasta con la respuesta del grupo 2, por lo que es posible que en el grupo 4 el papel de la arginina sea el de mantener en niveles basales la actividad de arginasa, ya que como se puede ver en el grupo 3 esta actividad disminuye ligeramente; observando y comparando la respuesta del grupo 2 con la del grupo 4 podemos decir que el estado diabético también afecta al metabolismo de la L-arginina.

Como podemos observar en la figura 26 los valores de urea basal aumentan muy significativamente desde cero hasta valores de aproximadamente 10 pmol/mg de proteína, esto es un gran indicio para el seguimiento del metabolismo de la arginina hacia la producción de poliaminas, ya que un aumento en la cantidad de urea, automáticamente indica un aumento en la cantidad de ornitina, precursor de las poliaminas, por lo que es muy probable que este aminoácido esté incrementado en los dos grupos tratados con arginina.

Siguiendo con las poliaminas, observamos un comportamiento muy especial de estos compuestos:

Comenzando con putrescina, podemos ver que presenta en los grupos tratados con el aminoácido, incrementos no significativos comparado con los controles, el comportamiento que sigue esta poliamina es similar al comportamiento en la actividad de arginasa, como se puede apreciar cuando se compara la figura 25 con la figura 28, por lo que la arginina puede estar siendo metabolizada para la formación de poliaminas en los grupos tratados con arginina.

En cuanto a la espermina y espermidina puede observarse que disminuyen gradualmente su concentración cuando se administra arginina, aunque para la espermina esta disminución no fue significativa es notorio que existe una ligera reducción en la concentración de esta poliamina.

Posiblemente una explicación para este comportamiento de las poliaminas es que las células se encuentren en la fase S del crecimiento mitótico como lo demuestran los resultados del análisis de la concentración de proteínas en páncreas (figura 24), en esta fase la actividad de la ODC se encuentra incrementada (36), por lo que los niveles de putrescina en esta etapa deben de ser elevados, lo cual explica el incremento de putrescina en las muestras tratadas;

Se ha demostrado en varias especies que una estimulación vagal produce liberación de insulina y glucagon (44), si esto lo relacionamos con el hecho de que en el páncreas la putrescina se transforma en gama aminobutirato (21,35) podemos decir que al transformarse la putrescina a este neurotransmisor es posible que se estimule la liberación de insulina por el nervio vago.

Lo anterior puede ser una de las explicaciones del porque la L-arginina estimula la liberación de insulina en el páncreas

Al encontrarse la célula en fase S, el DNA tiene que desplegarse y abrirse para que se lleve a cabo la replicación, lo anterior no lo podría hacer si hubiera espermina presente en grandes cantidades, como se ha demostrado en estudios realizados con E. coli donde se ha observado que administrando dosis altas de esta poliamina se detiene la síntesis de proteínas y la duplicación del DNA (36), por lo que es posible que en estos momentos de la fase S la espermina presente sea interconvertida a putrescina (figura 2) (ruta de las poliaminas), posteriormente cuando esta fase termine, toda la putrescina acumulada por las dos rutas mencionadas puede ser utilizada para la formación de espermina lo cual daría lugar a una estabilización del DNA replicado al finalizar la fase S de síntesis del ciclo celular, esto se corrobora con el hecho de que en la fase de crecimiento G1 la espermina y espermidina incrementan sus concentraciones (36); lo anterior explica el porque de la disminución en la concentración de espermina y espermidina.

6) CONCLUSIONES:

De acuerdo con las evidencias encontradas en este trabajo y con las referencias consultadas, podemos concluir lo siguiente:

1) La L-arginina es metabolizada en el páncreas llegando a la biosíntesis de poliaminas.

2) La ruta metabólica de L-arginina conduce a la biosíntesis de putrescina

3) La disminución de la concentración de espermina y espermidina puede deberse a un efecto protector hacia el DNA, para que pueda haber un proceso de replicación adecuado en la síntesis de proteínas.

4) El metabolismo de la L-arginina es disminuido en condiciones de diabetes experimental.

5) En condiciones de diabetes, la L-arginina tiende a recuperar la función pancreática.

7) **COROLARIO:**

TECNICAS UTILIZADAS EN LABORATORIO

PROTEINAS: Método de Folin

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 del uso de este reactivo. El reactivo de Folin presenta grandes peculiaridades y algunas limitaciones, se ha estudiado con relación a efectos en variaciones de pH, tiempo de reacción, concentración de reactivos y sustancia que interfieren. Las reacciones a las que se debe el color final atribuible a la presencia de proteína son: A) reacción con el cobre en Alcalí 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 de reactivo A en un
volumen de reactivo B, se prepara al momento
de usarse.
- Reactivo de Folin - Ciocalteu (diluido en agua 1:2)
- Solución Estándar de Albumina bovina 0.2 mg/ml

APARATOS: Vortex mixer y colorímetro

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

Se adicionan 2 ml de reactivo C, se mezcla en el vortex mixer y se deja reposar diez minutos. Finalmente se adicionan 0.2 ml del reactivo D se mezcla y se deja reposar 20 minutos. Leer en el colorímetro a 530 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 660 nm del producto formado.

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

REACTIVOS:

Reactivo A: 1g de dicromato de potasio se coloca en 50 ml de ácido sulfúrico concentrado. Calentar a 70 C.
Se prepara al momento de usarse
Solución Estandar de Manosa o Manitol 2 mg/ml

APARATOS:

Parrilla Eléctrica
Colorímetro
Vortex Mixer

TECNICA:

Se toman 50 ul de homogenizado, en caso de muestras de páncreas, se toman 10 ul, los cuales se añoran a 1ml. Posteriormente se adicionan 2 ml del reactivo A frío. Se mezcla y se deja reaccionar por aproximadamente 10 minutos, posteriormente se enfría y se lee a 660 nm.

ACTIVIDAD DE ARGINASA y UREA BASAL:

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 Gihetti y colaboradores (75 de maricel) quienes han hecho notar que solo algunos procedimientos son útiles para medir la actividad de arginasa en extractos de tejido u homogenizados. La aparición de 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 85 C. Lo que indica que el producto es afectado por la temperatura.

REACTIVOS:

Reactivo A:	diacetilmonoxima al 3%	3.5 ml
	Tiosemicarbazida	0.005 g
	c.b.t	25 ml

Reactivo B: 0.1 ml FeCl₃ 0.12 M en H₂PO₄ al 56.7 %
100 ml H₂SO₄ al 20 %

Solución Estandar de Urea 15 ug/ml

APARATOS: Parrilla eléctrica, Colorímetro

TECNICA: Colocar 200 ul de homogenizado en 0.5 ml de buffer (MnCl₂ 0.002 M, Tris HCl 0.004 M, sol. salina 0.9%). Calentar a 55 C durante 1 hr para activar a la enzima. Centrifugar a 300 rpm. Diluir 1:10. Tomar 0.9 ml y adicionar 0.1 ml de una solución de 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 200 ul, completar a 1 ml con agua. Adicionar 1 ml del reactivo A, 2 ml del reactivo y calentar 25 minutos a 95 C. Enfriar leer a 530 nm.

Para la determinación de urea basal se siguen los mismos pasos, solo que se omite el de la activación de la enzima con el buffer MnCl₂-Tris HCl

DETERMINACION DE POLIAMINAS:

FUNDAMENTOS: Las poliaminas son bases alifáticas que se presentan en las células eucariontes unidas covalentemente a ácidos nucleicos, por lo que pueden ser removidas de estos compuestos por medio de una hidrólisis ácida ligera.

Estos compuestos, después de un proceso de lavados en el tejido hidrolizado, son derivados para su cuantificación por medio de Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC), el derivado generalmente utilizado para la cuantificación de las poliaminas es el derivado dabsilado, y se obtiene haciendo reaccionar a las poliaminas con cloruro de dabsilo en condiciones totalmente anhidras ya que de lo contrario el compuesto al momento de formarse es hidrolizado.

REACTIVOS: Solución de HCl 6 N
Solución de HCl 0.05 N
Estuche de reactivos para dabsilación, marca Beckman
Tetrahidrofurano grado HPLC
Agua desmineralizada y libre de compuestos orgánicos

APARATOS: Centrífuga
Vortex mixer
Columna C18 radial pak- nova pak de 4 u, Millipore &
Columna C18 de 10 u, Li Chrosob, Merck
Cromatografo Líquido de Alta Resolución (HPLC)

TECNICA: Tomar 1 ml de homogenizado de páncreas y agregarle 10 ul de HCl 6N e incubar durante 1 hora a 37 C, después de este tiempo centrifugar a 3000 rpm 15 minutos, recolectar el sobrenadante y realizar tres enjuagues con agua destilada al precipitado, centrifugando en cada uno de los enjuagues, evaporar a sequedad el sobrenadante a 60-70 C en calor húmedo recuperar el residuo con 500 ul de HCl 0.05 N, centrifugar este a 3000 rpm 15 minutos; tomar una alícuota de 10 ul del sobrenadante evaporar a sequedad en ampollitas para 1 ml, agregar 20 ul del reactivo #3 y 40 ul del reactivo #4 del estuche de reactivos para dabsilación, sellar la ampollita y calentar a 70 C durante 12 minutos, enfriar 5 minutos, abrir la ampollita y aferrar a 500 ul con el buffer #5 del estuche para dabsilación, tomar una alícuota de 10 ul e inyectarla al aparato de HPLC previamente preparado (fase móvil: THF grado HPLC)(detector ajustado a una longitud de onda 425 nm).

B) BIBLIOGRAFIA:

- 1)
BANDISODE S. MADHUKAR
EFFECT OF ARGININE AND GLUCAGON ON PERFUSED PURIFIED BETA CELLS
.BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., mar, 151(2), 948-53, 1988
- 2)
BERNAL A., MENDEZ J.D. Y ROSADO A.
DETERMINACION RAPIDA DEL PESO SECO POR COLORIMETRIA
.ARCH. INVEST. MED. (MEX)., 12(), 83-88, 1981
- 3)
BRONME H.J., HAHN H.J., LUCKE S., HILDEBRANT W. AND BLECH W.
ARGININE STIMULATED INSULIN AND GLUCAGON RELEASE FROM ISLETS
TRANSPLANTED INTO THE LIVER OF DIABETIC RATS
.HORM. METAB. RES., 21(), 507-509, 1988
- 4)
CAHALDI A.A AND ALGRANATI I.D.
POLAMINES AND REGULATION OF ORNITHINE BIOSYNTHESIS IN
Escherichia coli
.J. BACTERIOL., abr, 171(4), 1998-2002, 1989
- 5)
CLIFFORD A. RINEHART JR AND EVANGELOS S. CANELAKIS
INDUCTION OF ORNITHINE DECARBOXYLASE ACTIVITY BY INSULIN AND GROWTH
FACTORS IS MEDIATED BY AMINOACIDS
.PROC. NATL. ACAD. SCI. USA., jul, 82(), 4365-4368, 1985
- 6)
CONSOLLY A., ANGELUCCI E., CAPPANI F., RIARIO-SFORZA G., SENSI S.
BYPHASIC RESPONSE OF INSULIN SECRETION TO ARGININE STIMULATION,
DAILY CHANGES
.BOLL. SOC. ITAL. BIOL. SPER., jan, 59(1), 490-3, 1983
- 7)
CUNNINGHAM R. SUSANNA AND WERNER K. MAAS
ISOLATION, CHARACTERISATION, AND MAPPING OF *Escherichia coli*
HUANTS BLOCKED IN THE SYNTHESIS OF ORNITHINE DECARBOXYLASE
.J. BACTERIOL., nov, 124(2), 791-799, 1975
- 8)
CURRY D.L., SAFAIRIK AND E. REAVEN
EFFECT OF AGE ON THE INSULIN SECRETORY RESPONSE OF PERFUSED RAT
PANCREAS TO ARGININE AND TOLBUTAMIDE
.HORM. METAB. RES., 19(), 453-57, 1987
- 9,10)
DEGROOT L.J., CAHILL JR. G.J., ODELL W.D.
ENDOCRINOLOGY
.ED. GRUNE & STRATFORD, 74-76, VOL. 2(CAP.), N. Y. USA, 1979

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

11)

DIMITRIADIS D.G., PHELING B.G., AND GERICH E.J.
ABNORMAL GLUCOSE MODULATION OF ISLET A- AND B- CELL RESPONSES
TO ARGININE IN NON INSULIN DEPENDENT DIABETES MELLITUS
.DIABETES , Jun, 34(6), 541-7, 1985

12)

ELGAVISH A., WALLACE V.R., PILLION J.D. AND MEEZAN E.
POLYAMINES STIMULATE D-GLUCOSE TRANSPORT IN ISOLATED
RENAL BRUSH-BORDER MEMBRANE VESICLES
.BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA., 777(1), 1-8, 1984

13)

FEUERSTEIN B.G., WILLIAMS L.D., BASU HS., HARTON L.J.
IMPLICATIONS AND CONCEPTS OF POLYAMINE-NUCLEIC ACID INTERACTIONS

.J. CELL. BIOCHEM., 46(), 37-47, 1991

14)

FOWDEN L. ABIGAIL
THE EFFECT OF ARGININE ON INSULIN RELEASE FROM THE FOETAL
SHEEP PANCREAS
.PROC. PHYSIOL. SOC., Jun, (), 64P-65P, 1977

15)

FRANKEL J. BARBARA, HELDT M. ANNELIESE AND GRODSKY M. GEROLD
EFFECTS OF K⁺ AND ARGININE ON ISULIN RELEASE FROM THE IN VITRO
PERFUSED RAT PANCREAS
.ENDOCRINOLOGY., 110(), 428-431, 1982

16)

GILES K.W. AND MYERS A.
AN IMPROVED DIPHENILAMINE METHOD FOR THE ESTIMATION OF
DESOXYRIBONUCLEIC ACID
.NATURE., 206(), 93, 1965

17)

GOTO Y., SEINO Y., TAMINATO AND IHURA H.
FRUCTOSE: INHIBITION OF GLUCAGON AND STIMULATION OF INSULIN
RESPONSES TO ARGININE IN THE ISOLATED PERFUSED RAT PANCREAS
.J. ENDOCRINOL., 69(), 295-296, 1976

18)

GRILL V. AND HERBERG L.
GLUCOSE AND ARGININE-INDUCED INSULIN AND GLUCAGON RESPONSES FROM THE
ISOLATED PERFUSED PANCREAS OF THE DD-WISTAR DIABETIC RAT. EVIDENCE FOR
SELECTIVE IMPAIRMENT OF GLUCOSE REGULATION. ACTA ENDOCRINOLOGICA., 102()

19)

GUYTON A.C.
TRATADO DE FISIOLIGIA MEDICA

.EDITORIAL INTERAMERICANA. 7a ED., MEXICO (D.F.), 914-921, 1989

20)

HEBY O, PERSSON L.
MOLECULAR GENETICS OF POLYAMINES SYNTHESIS IN EUKARYOTIC CELLS

.TIBS, abr, 15(), 153-158, 1990

21)

HOUGAARD H.D., NIELSEN H.J. AND LARSSON L.
LOCALIZATION AND BIOSYNTHESIS OF POLYAMINES IN INSULIN-PRODUCING CELLS

.BIOCHEM. J., 238(), 43-47, 1986

22)

J. FRANKEL BARBARA, E. GERICH JOHN, E. FANSA RUDOLPH, C. GUERRITSEN GEORG
RESPONSES TO ARGININE OF THE PERFUSED PANCREAS OF THE GENETICALLY
DIABETIC CHINESE HAMSTER

.DIABETES, mar, 24(3), 272-279, 1975

23)

JOHANSON H., GYLFE E., AND HELLMAN B.
THE ACTIONS OF ARGININE AND GLUCOSE ON GLUCAGON SECRETION ARE MEDIATED
BY OPPOSITE EFFECTS ON CYTOPLASMIC Ca^{2+}

.BIOCHEM. BIOPHYS. RES COMMUN., ago, 147(1), 309-14, 1987

24)

JOHNSON W.T., AND NORDLIE R.
STIMULATION OF GLUCOSE 6 PHOSPHATASE BY POLYAMINES IS A MEMBRANE
MEDIATED EVENT

.LIFE SCI., 26(4), 297-307, 1980

25)

KING J.T., BROOKS, S.B., JACKWAY J.P., LEONARD L. AND TALMAGE D.W.
SUPPRESSION OF VITRO CITOTOXIC RESPONSE BY MACROPHAGES DUE
INDUCED ARGINASE

.J. EXP. MED., 146(), 665-671, 1977

26)

KISHINO Y. AND KAWAMURA S.
PANCREATIC DAMAGE INDUCED BY INJECTING A LARGE DOSE OF ARGININE

.VIRCHOWS ARCHIVE [CELL PATHOLOGY], 47(), 147-155, 1984

27)

KRALI L.P., BEASER R.S.
JOSLIN DIABETES MANUAL

.LEA & FEBIGER, USA, 12a ed. (), 1989

28)

LANSTER I.B., ROSEMARY D., MANDELLA S.M., SOVE AND D.S. HARPER
THE POLYAMINES PUTRESCINE, SPERMIDINE AND SPERMINE
IN HUMAN GINGIVAL CREVICULAR FLUID

.ARCHS. ORAL BIOL., 32(5), 329-333, 1987

29)

LEAHY J.L., BONNER-WEIR S., WEIR G.C.
ABNORMAL GLUCOSE REGULATION OF INSULIN SECRETION
IN MODELS OF REDUCED B-CELL MASS
.DIABETES, jul, 33(), 667-673, 1984

30)

LOCKWOOD D.H., LIPSKY J.J., MERONK 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

31)

LOWKY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. AND RANDALL R.J.
PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN-PHENOL REAGENT
.J. BIOL. CHEM., 193(), 265, 1951

32)

MENCHINI M., MESCHI F., LANBIASE R., PUZZOVIO M., DEL GUERCIO M.J.
C-PEPTIDE RESPONSE TO ARGININE STIMULATION IN DIABETIC CHILDREN
.J. PEDIATR., mar, 96(3 Pt 1), 362-6, 1980

33)

HIZUNUMA T., KAWAMURA S., AND KISHINO Y.
EFFECTS OF INJECTING EXCESS OF ARGININE ON RAT PANCREAS
.J. NUTR., 114(), 467-471, 1984

34)

MOHAN C., BESSHAN S.P
INSULIN "INHIBITION" OF GLUCONEOGENESIS BY STIMULATION OF
PROTEIN SYNTHESIS
.BIOCHEM. MED., jun, 26(), 403-426, 1981

35)

MORGAN DAVID M.L.
POLYAMINES
.ESSAYS IN BIOCHEMISTRY., 23(), 82-113, 1987

36)

MORIS DAVID R
A NEW PERSPECTIVE ON ORNITHINE DESCARBOXYLASE
REGULATION: PREVENTION OF POLYAMINE TOXICITY IS THE
OVERRIDING THEME. J. CELL. BIOCHEM., 46(), 102-105, 1991

37)

HORRISSET J. AND BENREZZAK O.
POLYAMINES AND PANCREATIC GROWTH INDUCED BY CAERULEIN
.LIFE SCI., 35(), 2471-2480, 1984

38)

NOGOWSKY L. AND NOVAK K.W.
ARGININE ADMINISTERED IN VARIOUS WAYS, AS A STIMULATOR OF INSULIN
SECRETION IN THE RABBIT
SUBJECTS. *HORM. METAB. RES.*, 10(1), 730-33, 1986

39)

ORCI L.
MACRO- AND MICRO-DOMAINS IN THE ENDOCRINE PANCREAS

. *DIABETES*, jun, 31(1), 538-565, 1982

40)

ORCI L., VASSALLI J-D, PERRELET A.
LA FABRICA DE INSULINA

. *INVESTIGACION Y CIENCIA*, nov, (143), 52-63, 1988

41)

POUSTIER P., NAKHOODA F.A., GROSE M., AND MARLISS B.E.
ARGININE-INDUCED GLUCAGON SECRETION IN THE SPONTANEOUSLY DIABETIC
BB WISTAR RAT
. *METABOLISM*, may, 32(5), 487-91, 1983

42)

RASKIN P.
ISLET-CELL ABNORMALITIES IN NON-INSULIN-DEPENDENT
DIABETES MELLITUS

. *AM. J. MED.*, ago, 79(23), 2-5, 1985

43)

RODRIGUEZ A.C. Y NUNEZ J.C.
EL ENZIMA ARGINASA: BIOQUIMICA GENERAL, METABOLISMO,
INTERES DE LA DETERMINACION SERICA EN PATOLOGIA HEPATICA
. *REVISTA CLINICA ESPANOLA*, nov, 123(3), 213-219, 1971

44)

SEINO Y., NISHI S., AND IMURA H.
VAGAL MODULATION OF ARGININE- AND GLUCAGON- INDUCED PANCREATIC
SOMATOSTATIN SECRETION
. *LIFE SCI.*, 37(1), 651-656, 1985

45)

SOLOMON S.S., DUCKWORT C.W., JALLEPALLI P., BOBAL M. AND IYER R.
THE GLUCOSE INTOLERANCE OF ACUTE PANCREATITIS: HORMONAL
RESPONSE TO ARGININE
. *DIABETES*, ene, 29(1), 22-6, 1980

46)

TOBINAGA H., KOHIIYA I., JHONSON H.J., INMAN L., ALAM T., HOLTZ J.
LOSS OF INSULIN RESPONSE TO GLUCOSE BUT NOT ARGININE DURING THE
DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNE DIABETES IN BB/RATS: RELATIONSHIPS TO
ISLET VOLUME AND GLUCOSE TRANSPORT RATE. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.*,

47)

van HAEFTEN W.T., VOETBERG A.G., GERICH E.J., AND van der VEEN A.E.
DOSE-RESPONSE CHARACTERISTICS FOR ARGININE-STIMULATED INSULIN
SECRETION IN MASS AND INFLUENCE OF HYPERGLYCEMIA
.J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 69(5), 1059-64, 1989

48)

VILLAZON M.C.
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ARGINASA EN PANCREAS HUMANO
TESIS DE LICENCIATURA
.UNIVERSIDAD LA SALLE, MEXICO(D.F.), 1991

49)

ZERBIB A., RIBES G., GROSS R., PUECH R. AND LOUBATIERES-MARIANI M.H.
HYPERSENSITIVITY TO ARGININE OF BOTH B AND D PANCREATIC CELLS
IN ADULT STREPTOZOTOCIN-DIABETIC RATS
.ACTA ENDOCRINOLOGICA (COPENH), 121(), 345-349, 1989