

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

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

16
209

**"EFECTO DE L-ARGININA EN EL
PROCESO DE REPARACION
DE HERIDAS"**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
MARINA EUGENIA RAMIREZ ANDONEGUI**

**DIRECTOR DE TESIS:
D. EN C. JOSE DOMINGO MENDEZ F.**

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica Experimental de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del IMSS, bajo la dirección del D. en C. José Domingo Méndez F.

A DIOS ...

**a quien amo sobre todas las cosas
y me ha obsequiado el don de la vida**

A mi mamá , a quien tanto quiero , por su dedicación
y su apoyo que me ha brindado en cada instante de
mi vida.

A mi papá por su gran amor , su confianza y ejemplo de vida
recta que me guiará hacia el camino de Dios.

A mis hermanos , Gaby y Carlos , por su compañía , apoyo y
cariño a lo largo de mi vida.

Al Instituto Scifi , que me abrió sus puertas e hizo de mi una mujer
recta y valiente ante la vida

A mi compañera y amiga Ma. de los Angeles Guzmán Molina, a quien quise mucho y a quien dedico con gran cariño y respeto este trabajo.

A los profesores Angel y Otivia quienes vivieron una vida ejemplar dedicada a la enseñanza y siguieron siempre a Dios.

A miss Nora Buisse, quien es una gran mujer y cuyo modelo de vida me ha inspirado.

Al D. en C. José Domingo Méndez F. por su apoyo incondicional en la realización de esta tesis, así como su comprensión y paciencia.

OBJETIVO

Estudiar el efecto de L-arginina en el proceso de reparación de heridas en mucosa bucal en rata normal y diabética mediante parámetros bioquímicos específicos, que incluyen la medición de la actividad de arginasa, la concentración de hidroxoprolina, proteínas y DNA como indicadores de la actividad metabólica.

INDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 1. GENERALIDADES	4
1.1 Mucosa bucal	5
1.2 Diabetes Mellitus	14
1.3 Inflamación	28
1.4 Regeneración y Reparación	33
1.5 Arginina	37
1.6 Arginasa	41
1.7 Colágena	44
CAPITULO 2. MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	
2.1 Material biológico	53
2.2 Material básico	53
2.3 Reactivos básicos	53
2.4 Material químico y aparatos analíticos	53
2.5 Procedimientos de Laboratorio	54
CAPITULO 3. RESULTADOS	71
3.1 Resultados (Tablas y Gráficas).....	72
3.2 Análisis estadístico.....	85
DISCUSION	99
CONCLUSION	101
BIBLIOGRAFIA	102

INTRODUCCION

Dentro de los aminoácidos considerados semiesenciales para los mamíferos y las aves se encuentra a la L-arginina (1), cuya importancia radica en la participación de ésta en procesos metabólicos y bioquímicos, entre los que se encuentran el ciclo de la urea, la compactación de DNA al formar parte de histonas y protaminas y la participación en la síntesis de proteínas.

Entre otros procesos, la arginina participa directamente en la formación de tejido conjuntivo al elaborarse a partir de ella L-prolina y L-hidroxiprolina, aminoácidos importantes para la síntesis de colágeno en los fibroblastos (2). Se ha demostrado que la L-arginina incrementa el depósito de hidroxiprolina en los sitios específicos de las heridas. Seifter et al., adicionaron un suplemento de arginina en la dieta de animales heridos, y esto dio como resultado un incremento en el depósito de colágena (3).

El efecto de L-arginina en la reparación de la mucosa bucal lesionada es desconocido, por lo que se planteó el presente trabajo a fin de investigar sus efectos sobre la disminución del tiempo normal de reparación.

Se define la mucosa como el revestimiento de las cavidades del cuerpo que se comunica directa o indirectamente con el exterior y posee una superficie húmeda (4). La mucosa bucal es una continuación de la piel de los labios, de la mucosa del paladar blando y la faringe (5); actúa como barrera, transmite sensaciones del exterior (6), además de otras funciones (absorción, secreción y actividad masticatoria) (4). Está compuesta por un epitelio escamoso estratificado y un tejido conectivo denso subyacente (7). Se clasifica en tres categorías: mucosa de revestimiento, masticatoria y especializada. La mucosa de revestimiento incluye entre otros, a los carrillos. La mucosa en esta región se fija a los músculos más profundos y es flexible. Presenta un epitelio plano estratificado no queratinizado; su tejido conectivo está formado de tejido fibroelástico. El daño a la mucosa está seguido siempre por inflamación y su respuesta tiene muchas características en común con la reparación en otros sistemas orgánicos.

La reacción de los tejidos vivos a cualquier tipo de lesión se denomina inflamación, que comprende respuestas vasculares, neurológicas, humorales y celulares en el sitio de la lesión. Todos los elementos que integran los tejidos conectivos vascularizados participan y por lo tanto, cuanto más complicado sea el tejido, más complejo será el cuadro del proceso inflamatorio (8).

Quando el factor nocivo es superado, la inflamación cede y el tejido se repara (9). La reparación suele involucrar dos fenómenos: 1) la regeneración que ocurre si el tejido lesionado es reemplazado por células similares o idénticas y 2) la sustitución por un estroma de tejido conectivo que en su etapa permanente constituye una cicatriz. En la mayor parte de los casos los dos fenómenos contribuyen a la reparación, sin embargo, en unos pocos casos las heridas de la región bucal curan con formación de cicatriz (10).

Las enfermedades inflamatorias de la mucosa bucal son influenciadas por varios factores sistémicos como el estado hormonal y la condición metabólica. Se ha encontrado que existe una relación no generalizada entre las enfermedades de la mucosa bucal y la diabetes mellitus (11).

La diabetes mellitus comprende un grupo heterogéneo de condiciones que se manifiestan como hiperglucemia, causada por la deficiencia de insulina. Como resultado de lo anterior, poca glucosa penetra a las células, lo que ocasiona efectos importantes en los tejidos muscular, adiposo y hepático. Estas alteraciones metabólicas se asocian con varias complicaciones y la severidad de éstas se incrementa con la duración de la enfermedad (12).

A pesar de los grandes avances en el control de los niveles de glucosa, la mayor causa de morbilidad y mortalidad en diabetes es el desarrollo de complicaciones crónicas y en mayor grado las anomalías presentadas en el tejido conectivo, las cuales se caracterizan por la "acumulación" o "carencia" de elementos de este tejido en algunos otros sistemas tisulares (13).

Las complicaciones de la reparación de las heridas llegan a ser un problema de importancia para muchos diabéticos (3). Se ha estudiado la reparación de las heridas en los pacientes diabéticos utilizando heridas incisionales. Estos estudios se han llevado a cabo en animales con diabetes experimental (estreptozotocina). Se ha confirmado la disminución en la fuerza tensional y se ha demostrado un descenso en la producción de colágena en estos animales (14,15).

En estudios previos se han confirmado diferencias significativas en condiciones diabéticas en la mucosa bucal. Entre los hallazgos más frecuentes se incluyen deshidratación (23). En las encías y mucosas se observa cianosis o enrojecimiento de las membranas mucosas con eritema difuso o parestesia de la mucosa bucal, tumefacción y sensación de quemadura de la mucosa (24), demostrándose con éste y otros estudios realizados la presencia de alteraciones en el medio bucal en el estado diabético (12).

Debido a la importancia clínica que esto representa, se diseñó este estudio para investigar el efecto de L-arginina en la recuperación de heridas en mucosa bucal en ratas normales y diabéticas ya que previamente se ha demostrado que la arginina estimula la síntesis y liberación de insulina (16).

CAPITULO 1. GENERALIDADES

1.1 MUCOSA BUCAL.

La cavidad oral es un espacio irregular, limitado por los labios, carrillos y paladar.

Se denomina mucosa al revestimiento de las cavidades del cuerpo que se comunica directa o indirectamente con el exterior y posee una superficie húmeda.

La boca está revestida totalmente (excepto la superficie de los dientes) por una membrana mucosa (4).

La mucosa bucal (membrana mucosa) es una continuación de la piel de los labios, de la mucosa del paladar blando y la faringe (5).

Las funciones básicas de la mucosa bucal son esencialmente: actuar como barrera, transmitir sensaciones procedentes del ambiente exterior (6), además de realizar otras funciones (absorción, secreción y actividad masticatoria) (4).

En general aparece como una superficie húmeda de color rosado, de intensidad variable según la zona, en sectores móviles y en otros fija, lisa, plegada, rugosa o cubierta de papilas según la región y en gran parte sembrado de orificios de las glándulas salivales menores (17). El color de la mucosa bucal depende de tres factores principales: queratinización, vascularización y melanina (4).

La mucosa bucal en general está compuesta por un epitelio escamoso estratificado y un tejido conectivo relativamente denso subyacente (7). El epitelio escamoso estratificado sufre queratinización total, con formación de capa córnea en las partes de la boca expuestas a acción mecánica importante (encia, dorso de la lengua y paladar duro). En el resto de la boca se observa cierto aplanamiento de las células superficiales, pero éstas se descaman en gran cantidad sin perder su núcleo, ya que no se desarrolla ningún estrato córneo no granuloso (18).

En algunas regiones de la cavidad oral, la mucosa se haya unida directamente al periostio, en cambio en otras regiones la mucosa se encuentra separada del mismo por una capa (submucosa) de tejido conectivo laxo, adiposo o glandular que contiene importantes vasos sanguíneos y nervios. Las glándulas salivales se localizan en la profundidad del tejido conectivo y en la submucosa.

Las superficies de todas las regiones de la cavidad bucal se hallan tapizadas por epitelio escamoso estratificado, constituido por tres estratos:

- * Estrato basal
- * Estrato espinoso
- * Estrato córneo

El estrato basal se encuentra constituido por células epiteliales adyacentes a la membrana basal, las cuales son de forma cuboidea o cilíndrica y se disponen en una línea uniforme de una o dos células de espesor; representan la capa germinativa (6,7).

Por encima del estrato basal se encuentra el estrato espinoso. Este es relativamente ancho y sus células son grandes y poliédricas. Las células de la zona inferior muestran una considerable actividad mitótica; en la zona media y superior no se ve mitosis en condiciones normales. Cada célula se encuentra delimitada por paredes celulares, se encuentran separadas brevemente y se relacionan entre ellas mismas mediante puentes intercelulares (4,7). Tienden a achatarse a medida que se acercan a los estratos superficiales. La zona granulosa se sitúa por encima del estrato espinoso y está constituida por células de mayor tamaño y aplanadas que contienen gran cantidad de gránulos (queratinocitos) que ellas mismas elaboran; éstos han sido llamados también queratohialinos. En esta zona no hay división celular.

La zona superficial es queratinizada o cornificada y es denominada estrato córneo. Consta de una masa de células aplanadas que contienen queratina. Su profundidad varía en la mucosa bucal dependiendo de la naturaleza del tejido. De acuerdo con la estimulación por influencias traumáticas, se ha demostrado que esta estimulación a la mucosa bucal produce un aumento de queratinización (4,6,7). El estrato córneo se caracteriza por la descamación de sus elementos celulares.

Tejido conectivo

A la zona de unión entre el tejido conectivo y el epitelio se denomina membrana basal que es parte de la sustancia fundamental del tejido conectivo (7). Esta zona constituye la unión del epitelio con los tejidos profundos; controla el paso de sustancias hacia dentro y fuera del epitelio, probablemente ejerciendo una interacción con éste último.

El tejido conectivo de la mucosa bucal y del resto del organismo es similar. Está compuesto por densas bandas de fibras colágenas y numerosos vasos sanguíneos y nervios (6). Entre los tipos de células presentes en el tejido conectivo se encuentran: mastocitos, fibroblastos, macrófagos, linfocitos, granulocitos neutrófilos y plasmocitos (6,19).

La célula predominante en el tejido conectivo es el fibroblasto (65% de la población celular total). Es una célula grande y estructuralmente es de dos tipos. El primero tiene forma de estrella, considerado como importante en la producción de colágena (ver figura 1), y otros componentes de la matriz. El segundo tipo son menos activos y algunas veces se denominan fibrocitos, siendo más pequeños y en forma de uso. Participan en la reparación tisular (6,19). Normalmente se encuentran distribuidos en el tejido conectivo (7).

El fibroblasto es el principal productor de diversos tipos de fibras halladas en el tejido conectivo e interviene en la síntesis de la matriz de éste. Además posee la capacidad de digerir y degradar fibras colágenas, presentes en el tejido conectivo propio (5,6).

Los mastocitos se derivan de precursores de la médula ósea (19). Son grandes, esféricos o elípticos, responsables de la producción de ciertos componentes de la matriz. Producen sustancias vasoactivas que afectan la función del sistema microvascular y controlan el flujo de sangre a través del tejido (5,6).

El macrófago es una célula grande en forma de estrella, derivada de las células de la línea de los monocitos sanguíneos que se infiltran en el tejido conectivo y se desarrollan en fagocitosis. Los macrófagos residentes pueden proliferar y formar macrófagos adicionales. Contienen muchos lisosomas que ayudan a digerir el material fagocitado, lo cual demuestra el importante papel defensivo que desempeñan como fagocitos, ayudando a conservar de esta forma la integridad del tejido conectivo. Para eliminar las partículas extrañas grandes, los macrófagos se fusionan entre sí y forman células gigantes multinucleares (20,6). Participan en la respuesta inmunológica. Los macrófagos son numerosos en el tejido conectivo inflamado.

Las fibras del tejido conectivo son producto de los fibroblastos (5). Los tipos de fibras varían en los diferentes lugares y estructuras.

El tejido conectivo contiene un sistema importante de haces de fibras colágenas, identificándose al menos 4 tipos distintos de éstas (I, II, III, IV).

Existen muchos tipos de colágena, algunos de los cuales forman fibras. Con frecuencia estas fibras se unen para formar haces de fibras. Una vez formadas las fibrillas colágenas aumenta su estabilidad, a medida que se desarrollan enlaces cruzados covalentes entre las moléculas colágenas, con el resultado de una reducción de la solubilidad del colágena vinculada a la edad (5,6).

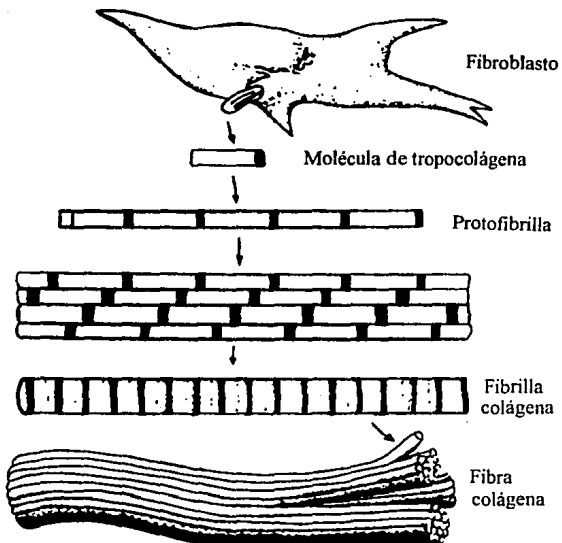


FIGURA 1. Producción de colágena a partir del fibroblasto.

Se distinguen dos tipos de fibras reticulares las cuales son químicamente idénticas a la colágena, pero más delgadas. Se encuentran con frecuencia en el tejido embrionario en desarrollo y alrededor de las fibras colágenas en el tejido conectivo maduro. El otro tipo puede representar una forma inmadura de colágena (6).

Las fibras elásticas, presentes en la mayoría de las regiones de la mucosa, están constituidas por elastina. Son abundantes en las mucosas laxas y móviles de revestimiento. En las encías se les encuentra junto a los vasos sanguíneos.

Las fibras oxitalánicas aparecen en todas las estructuras del periodonto. Están compuestas de elementos fibrilares y amorfos (6).

La matriz es el medio en el cual están incluidas las células del tejido conectivo y es esencial para mantener el funcionamiento normal del mismo (5). Es producida por los fibroblastos, aunque parte de sus componentes proviene de los mastocitos y de la sangre.

El epitelio que cubre el tejido conectivo es avascular, pero el tejido conectivo subyacente a la mucosa oral, se halla extremadamente vascularizado, lo cual explica su color rojo. El tejido conectivo está innervado principalmente por fibras sensitivas. Se ha descrito presencia de terminaciones nerviosas especializadas (corpúsculos de Meissner o de Ruffini, terminaciones bulbosas de Krause y órganos terminales mucocutáneos) (6,5,19). Los principales elementos glandulares de la mucosa oral son las glándulas salivales. Se encuentran también glándulas sebáceas en la mayor parte de los adultos, situadas en las mucosas de revestimiento, especialmente a nivel de los carrillos (6).

La mucosa bucal difiere en alto grado de una región a otra. En base a diferencias regionales, de estructura y función (6) se clasifica en tres categorías:

- 1) Mucosa de revestimiento
- 2) Mucosa masticatoria
- 3) Mucosa especializada (Ver cuadro 1)

CUADRO I. Tipos de mucosa bucal y tejidos que la constituyen

	Enclá
Mucosa Masticatoria	Mucosa del Paladar duro
	Piso de la boca
	Labios
	Carrillos
Mucosa de revestimiento	Paladar Blando
	Mucosa alveolar
	Superficie ventral de la lengua
Mucosa especializada	Dorso de la lengua

Mucosa de revestimiento

La mucosa de revestimiento recubre la mayor parte de la cavidad bucal, incluidos los labios, carrillos, piso de la boca, superficie ventral de la lengua y paladar blando (6). Tanto en los labios como en los carrillos se encuentra una submucosa que fija la mucosa a los músculos más profundos, por lo que en estos sectores es flexible y no se halla unida con firmeza a una estructura ósea. Esta fijación impide la formación de pliegues durante la masticación, lo que hace difícil el traumatismo de la mucosa durante este proceso.

La mucosa en estas áreas se extiende por el fondo del saco vestibular (6). La superficie interna de los labios y los carrillos tiene una capa de epitelio bastante gruesa de tipo plano estratificado no queratinizado. Es el tipo de epitelio característico de las superficies epiteliales húmedas. Las células superficiales de este epitelio están sometidas al roce, desprendiéndose de la superficie y siendo sustituidas desde las capas más profundas (21).

El tejido conectivo de la mucosa de revestimiento está formado de tejido fibroelástico. Sus fibras colágenas y elásticas son más delgadas que las de la dermis. Este tejido es bastante denso y penetra en el epitelio constituyendo así las papilas de tejido conectivo. La parte más profunda se une con la submucosa, la cual contiene fibras elásticas planas y gran número de vasos sanguíneos, por lo que el tejido conectivo está altamente vascularizado. Bandas de tejido fibroelástico penetran a través de la submucosa elástica para unirse con el tejido fibroelástico que acompaña al músculo situado debajo de la mucosa, la parte más consistente de la pared de la mejilla.

En la submucosa de los labios y los carrillos, aparecen pequeñas glándulas mucosas, algunas de ellas con unas pocas formas secretorias semilunares de tipo seboso en la parte interna de la mejilla (18,21).

Mucosa masticatoria

La mucosa masticatoria recubre el paladar duro y la encía, a la cual está firmemente adherida (6).

a) Encía. Las encías tienen un epitelio de tipo queratinizado con papilas de tejido conectivo altas y ricamente vascularizadas, lo que les confiere el color rosado. El tejido conectivo contiene gruesas fibras de colágena, que se continúan con el periostio del alvéolo dentario, puesto que no existe submucosa. No aparecen glándulas (18).

b) Paladar. Esta mucosa cubre la estructura ósea palatina y está firmemente unida al tejido conectivo subyacente. Está cubierto por un epitelio cornificado con papilas altas. En el rafe palatino falta la submucosa. En la parte anterior de la submucosa se encuentra tejido adiposo y en la parte posterior presenta glándulas mucosas (21,7).

Mucosa especializada

Mucosa del dorso de la lengua. La mucosa que recubre la superficie dorsal de la lengua está dividida en dos partes: la que cubre los dos tercios anteriores y la que cubre el tercio posterior. La primera está cubierta con pequeñas papilas, no así la mucosa posterior (21).

Tales papilas están en relación con una proyección del tejido conectivo que dan lugar a elevaciones del epitelio por encima del nivel general de la superficie lingual.

La mucosa que recubre la parte posterior contiene numerosas glándulas mucosas, algunas de las cuales se localizan en la punta y en los bordes de la lengua. La mucosa se halla firmemente unida al tejido conectivo que rodea a los músculos sin que exista una submucosa (6).

Reparación de la mucosa bucal

En la cavidad bucal, la capacidad de reparación de los tejidos varía mucho. Se ha calculado que el epitelio oral se renueva completamente en unos 4 o 6 días. El dorso de la lengua posee el potencial regenerativo más rápido; le siguen el carrillo, el paladar y la superficie ventral de la lengua, mientras que las encías son las que más lentamente se reparan. El tejido conectivo posee buena capacidad reparadora. Las heridas de la mucosa bucal sanan rápido y eficazmente (22).

La reparación en la mucosa después de la acción de un agente lesivo es mediante unión primaria. Para ilustrar este proceso se consideran 5 tipos de heridas bucales, siendo de suma importancia en la mucosa bucal, la preparación por unión primaria:

- 1) Heridas que se reparan por unión primaria
- 2) Heridas que se reparan por unión secundaria
- 3) Heridas causadas por extracción dentaria
- 4) Trasplante y reimplante de dientes
- 5) Fractura de maxilares

En las heridas que se reparan por unión primaria, la herida cura sin cicatriz, ya que las superficies incididas están próximas o se encuentran suturadas firmemente.

El primer paso es la formación de un coágulo que contribuye a mantener juntas las partes; la zona de inflamación se presenta edematosa y contiene polimorfonucleares y macrófagos que renuevan los detritos. Los fibroblastos y las yemas capilares se organizan dentro del coágulo. Las yemas son primeramente sólidas, pero pronto se canalizan y aparecen fibras colágenas entre los fibroblastos. El coágulo es paulatinamente reemplazado por tejido de granulación. El epitelio crece sobre la herida y la reparación es casi completa. En las últimas etapas se observa un progresivo aumento de la cantidad de colágeno y una disminución del número de células inflamatorias (22).

Cambios en la mucosa bucal por diabetes

La diabetes es común en nuestro medio. Ocasiona alteraciones en diferentes aparatos y sistemas del organismo; la cavidad oral no es la excepción (Cohen y cols. 1980; Gusberti y cols. 1982; Galca y Aganovic, 1986).

Los cambios en la cavidad oral por la diabetes se manifiestan generalmente por xerostomía, debido a la eliminación excesiva del líquido por los riñones (22). Clínicamente se observa en el paciente diabético deshidratación de la mucosa bucal (23). En las encías y mucosas se puede presentar cianosis o enrojecimiento de las membranas mucosas con eritema difuso o parestesia en la mucosa bucal, tumefacción y sensación de quemadura de la mucosa oral (24).

Efecto de diabetes en la reparación

La diabetes mellitus está asociada con un defecto generalizado en el metabolismo del tejido conectivo ya que los fibroblastos disminuyen la producción de colágeno. Existen dos teorías que explican el efecto de reparación de los diabéticos. De acuerdo con la primera, la reparación defectuosa es un efecto secundario de la vasculopatía de los vasos pequeños. La segunda establece que la reparación deficiente es causada por problemas metabólicos (11).

1.2 DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es un trastorno crónico y generalizado del metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas de origen multifactorial, que se manifiesta en su forma totalmente desarrollada con hiperglucemia, glucosuria, aumento de la degradación proteica, cetosis y acidosis (25).

Esta enfermedad descrita en el año 70 a.C. por Arateo de Capadocia fue llamada "diabetes" que en griego significa "discurrir a través de" o "atravesar". En el siglo XVII fue Thomas Willis el que agregó el adjetivo "mellitus", que en griego significa miel. Finalmente en 1920 Moses Barrón postuló la hipótesis de que los islotes de Langerhans segregan una hormona que regula el metabolismo de carbohidratos (26).

Etiología

Es importante el papel de los factores de riesgo, aunque no todos son aceptados, ya que no son la causa directa de la diabetes en todos los pacientes, sino en aquellos genéticamente susceptibles, y éstos son (28):

1. obesidad (28)
2. herencia (29)
3. defecto o daño a las células β (27)
4. alteraciones en los receptores insulínicos
5. factores de autoinmunidad y sistema HLA (30)
6. senilidad
7. embarazo
8. anticonceptivos hormonales
9. fármacos con efecto hiperglucemiante
10. estrés
11. hábitos dietéticos y deficiencia nutricional
12. infecciones virales (31)
13. condición económica y medio ambiente
14. enfermedades graves
15. susceptibilidad racial
16. otras enfermedades

Clasificación

El Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos de América, desarrolló (1979) una clasificación internacional de la diabetes (32,33). La clasificación comprende los siguientes grupos:

1) *Diabetes mellitus Tipo I* (dependiente de insulina)

Se presenta generalmente en personas menores de 20 años de edad, aunque puede presentarse a cualquier edad. Comprende el 15 al 20% del total de los diabéticos. Por definición, sólo se incluyen los sujetos que dependen de forma permanente de insulina para controlar la hiperglucemia. Se caracteriza por un estado insulino-dependiente con tendencia a la cetosis o a la caquexia que puede llevar a la muerte si no se administra insulina. Se sospecha una etiología viral, así como autoinmune. Su inicio es súbito con polidipcia, poliuria y polifagia. En los primeros dos años puede presentarse una mejoría transitoria del cuadro, sin embargo, esto es temporal. Los objetivos del tratamiento son: combatir el estado catabólico, eliminar la glucosuria y alcanzar un estado de normoglucemia pre y postprandial. El tratamiento tiene como base la dieta, la administración diaria de insulina y ejercicio físico (25,34-36).

2) *Diabetes mellitus Tipo II* (no dependiente de insulina)

Se desarrolla después de la 4a. década correspondiendo al 80% de la población diabética. Es frecuente que haya obesidad. Su inicio es lento, pudiendo cursar asintomática por años o mostrar discreta progresión; sólo eventualmente conduce al desarrollo de cetoacidosis diabética. Pueden existir complicaciones tales como, la macro y microangiopatía, neuropatía y cataratas. Los niveles de insulina pueden ser bajos, normales o elevados aunque es más frecuente encontrar insulopenia moderada. La prevalencia de la enfermedad aumenta con la edad y el grado de obesidad; existe mayor susceptibilidad genética que en la diabetes tipo I. Los pacientes no necesitan insulina exógena para corregir la hiperglucemia, la cual mejora al disminuir de peso. Cuando algún factor etiológico interviene, la hiperglucemia se controla con dieta e hipoglucemiantes orales. En algunos casos los pacientes ya no responden a este tratamiento, convirtiéndose en insulino dependientes. Para lograr los objetivos terapéuticos de la diabetes tipo II, se tiene la dieta, el ejercicio y los hipoglucemiantes orales. La dieta debe tener 0.8 g/kg/día de proteínas, 50% de calorías, entre las que se incluyen 30% de carbohidratos. El aporte calórico varía de acuerdo con la edad, peso y ejercicio, el cual depende de la condición física del paciente. Por lo general se controlan adecuadamente con dieta y ejercicio, pero cuando no se consigue se pueden utilizar hipoglucemiantes orales, entre los que se encuentran las sulfonilureas que aumentan la producción de insulina, con incremento en el número de receptores y disminuyen la producción hepática de glucosa. Los hipoglucemiantes se seleccionan de acuerdo a la edad, estado cardiovascular, insuficiencia hepática y renal, embarazo o lactancia, alergia a las sulfonilureas y estrés (ver figura 2) (34-36).

FACTORES QUE PRODUCEN LA DIABETES TIPO I Y II

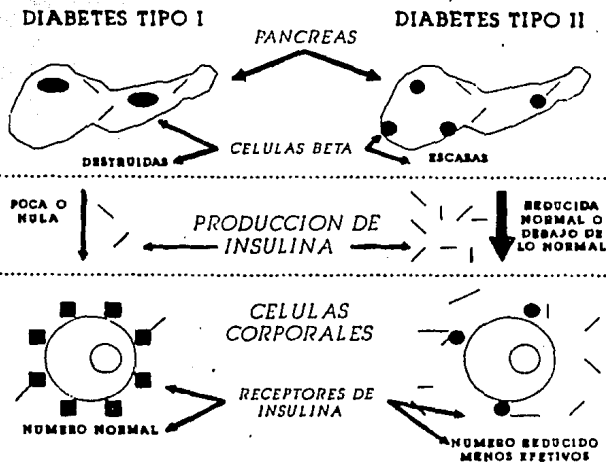


FIGURA 2

3) *Diabetes mellitus secundaria*

Esta variedad es rara y se relaciona con defectos e interferencias que causan alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y se pueden agrupar de la siguiente manera:

- a) destrucción hepática
- b) exceso de hormonas "antagónicas" a la insulina
- c) síndromes genéticos
- d) fármacos que pueden causar diabetes o intolerancia a los carbohidratos
- e) anormalidades a los receptores de la insulina (36)

4) *Diabetes gestacional*

Esto es cuando la enfermedad es descubierta durante el embarazo. Se asocia con alta morbi-mortalidad fetal, neonatal y materna. Después del parto, la intolerancia a los carbohidratos desaparece y en un plazo de 5 a 10 años, el 30% de las pacientes desarrollan diabetes. Su tratamiento no difiere de la diabetes sin embarazo. Cuando no se ha logrado el control de la glucemia se emplea la insulina valorando la edad gestacional. La dosis inicial de insulina es alrededor de 15 unidades y se usa la de acción intermedia iniciando con una dosis única y después fraccionando la dosis inicial (36-38).

5) *Intolerancia a los carbohidratos*

Se aplica cuando los niveles de glucemia en la curva de tolerancia a la glucosa están entre el límite de los normales y los considerados diabéticos. Del 1 al 5% desarrollan diabetes por año. Generalmente cursan asintomáticos y la intolerancia desaparece al disminuir de peso en forma espontánea (39).

6) *Antecedentes de intolerancia a carbohidratos*

Se aplica a aquellas personas que en alguna ocasión presentaron intolerancia, pero actualmente presentan una curva de tolerancia a la glucosa normal (40).

7) *Potencialidad o alto riesgo de desarrollar intolerancia a los carbohidratos*

Estos pacientes nunca han presentado intolerancia a carbohidratos, sin embargo, presentan un riesgo 4 veces mayor para desarrollarla.

Metabolismo normal de la glucosa

Los carbohidratos (azúcares, almidones y celulosa) son aldehídos o cetonas con fórmula empírica $(CH_2O)_n$. Se clasifican en monosacáridos o azúcares, oligosacáridos y polisacáridos. La mayor parte de los azúcares que aparecen en la naturaleza, tales como ribosa, glucosa y fructuosa son de la serie D.

Los disacáridos están constituidos por 2 monosacáridos unidos por un enlace covalente. Los polisacáridos contienen muchas unidades de monosacáridos unidas por un enlace glucosídico y algunos funcionan como formas de reserva de carbohidratos.

La glucosa es abundante en la naturaleza y está libre en algunos alimentos. Sólo tiene estructura de anillo de piranosa y forma parte de polisacáridos como almidón y glucógeno. La glucosa es el azúcar que se encuentra normalmente en la sangre y desde el punto de vista médico es importante como fuente de alimentación intravenosa.

Aspecto bioquímico

Los niveles de glucosa se mantienen relativamente constantes por las acciones del hígado en la captación o liberación de glucosa. En el hígado la glucosa se convierte en glucosa 6-fostato, intermediario clave en una serie de rutas metabólicas diferentes:

- a) formación de glucógeno,
- b) metabolismo via glucólisis
- c) oxidación mediante la desviación de la glucosa
- d) liberación a la sangre en forma de glucosa libre por la acción de la glucosa 6-fosfatasa

Glucólisis

Es el proceso mediante el que la molécula de glucosa se degrada enzimáticamente a través de una secuencia de reacciones para liberar 2 moléculas de piruvato (ver figura 3)

Una vez que la glucosa es convertida en glucosa 6-fosfato puede ser transformada en glucógeno por almacenamiento en la célula de la cual ya no puede salir. La glucosa que no ha sido convertida en glucógeno, pasa desde el hígado por la circulación general, hasta los tejidos donde puede ser oxidada, almacenada como glucógeno muscular o convertida en grasa y depositada como tal (41).

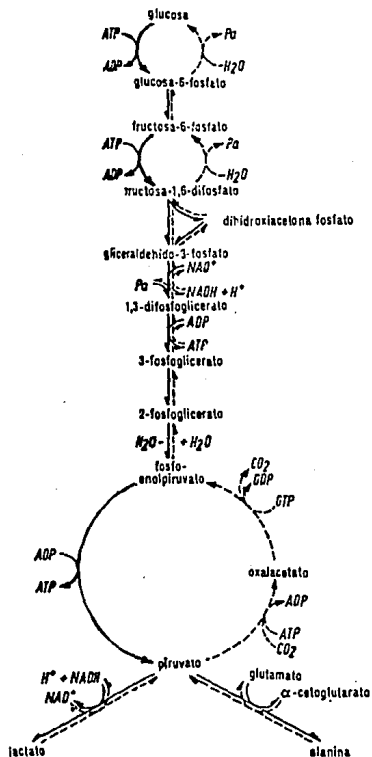


FIGURA 3. La glucólisis es la vía metabólica que permite la degradación de glucosa y de otros carbohidratos.

Regulación hormonal del metabolismo de la glucosa

Insulina

Es una proteína segregada por las células β de los islotes de Langerhans, siendo la hormona principal que controla el metabolismo de los carbohidratos (ver figura 4) (41). La insulina se secreta como respuesta a un aumento de la concentración de la glucosa y aminoácidos en la sangre (44). Su misión consiste en controlar el transporte de la glucosa desde el torrente sanguíneo hasta las células donde es oxidada (42).

La insulina es una pequeña proteína de peso molecular de 5808 compuesta por dos cadenas de aminoácidos conectadas entre sí por enlaces disulfuro (ver figura 5) (43).

Cuando se secreta esta hormona hacia la sangre, circula casi por completo en forma libre, sufriendo una semidesintegración plasmática que dura solo 6 minutos, de manera que se elimina de la circulación en un plazo de 10 a 15 minutos. Salvo por la parte de insulina que se combina con los receptores de la célula blanco, el resto se degrada, sobre todo en el hígado y en menor grado en el riñón.

Para iniciar sus efectos sobre la célula blanco, la insulina se fija primero a la proteína receptora la cual activa al receptor que inicia los efectos de la insulina. Los receptores activados excitan levemente al sistema AMPcíclico o segundo mensajero, que estimula las vías enzimáticas que inician las acciones conocidas de la insulina (ver figura 6 y 7) (43).

La glucosa que pasa a la sangre causa secreción rápida, que a su vez, determina la captación, el almacenamiento y el uso de la misma por todos los tejidos del organismo, pero en especial, el hígado, músculos y tejido graso.

Uno de los efectos más importantes de la insulina consiste en que la glucosa absorbida se almacene casi de inmediato en el hígado en forma de glucógeno. Cuando no se dispone de insulina y la concentración de glucosa en sangre comienza a disminuir, el glucógeno hepático es dividido de nuevo en glucosa que se libera otra vez a la sangre evitando que la glucemia disminuya excesivamente (43).

El mecanismo por el cual la insulina causa la captación y depósito de glucosa en el hígado incluye:

a) inhibición de la fosforilasa, la cual causa el desdoblamiento hepático del glucógeno en glucosa.

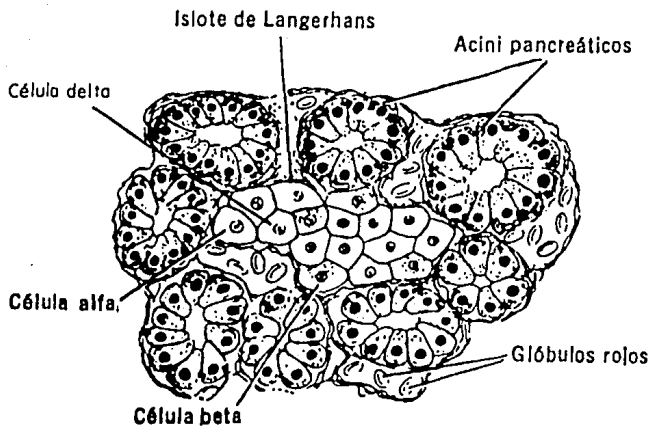


FIGURA 4. Anatomía fisiológica del páncreas.

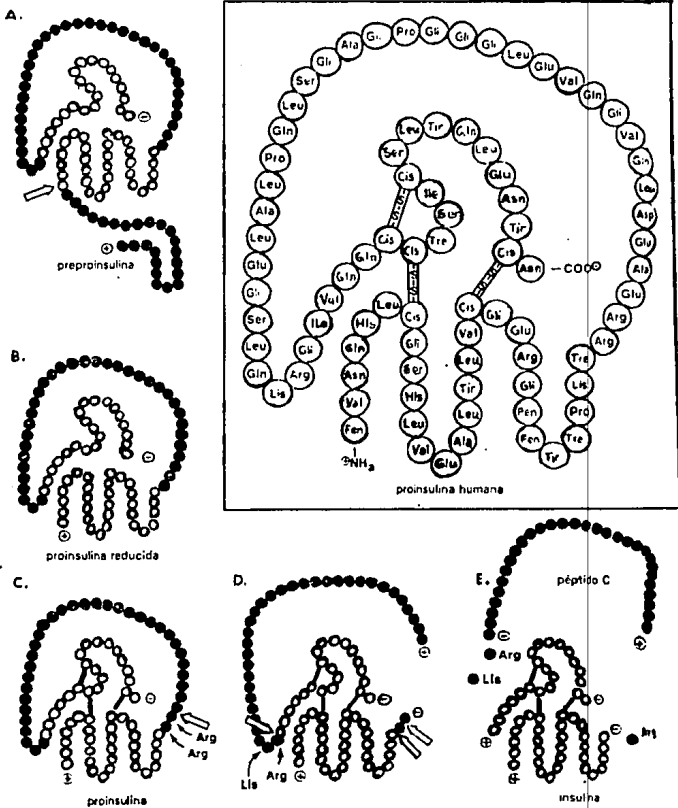


FIGURA 5. Secuencia en el procesamiento de insulina.

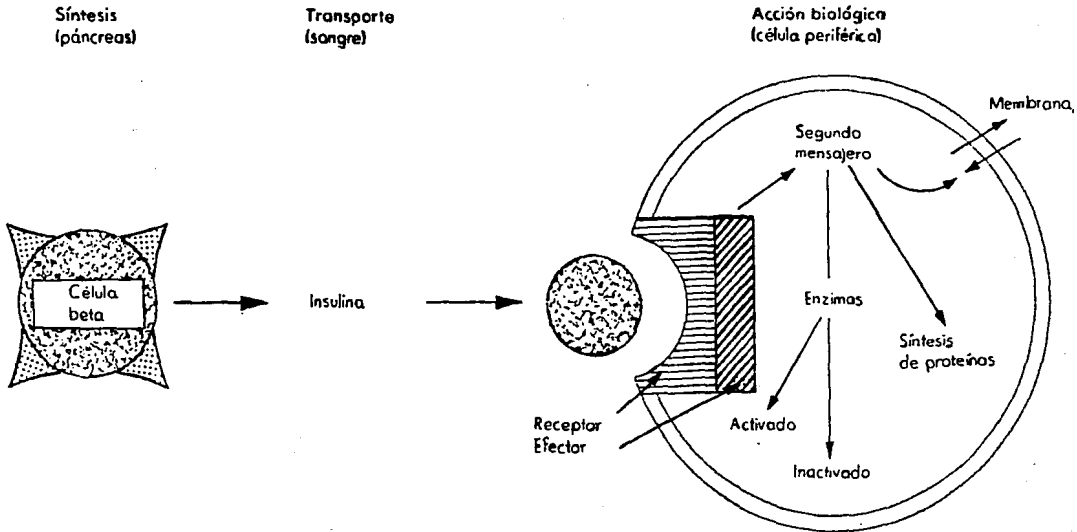


FIGURA 6. Mecanismo de acción de la insulina.

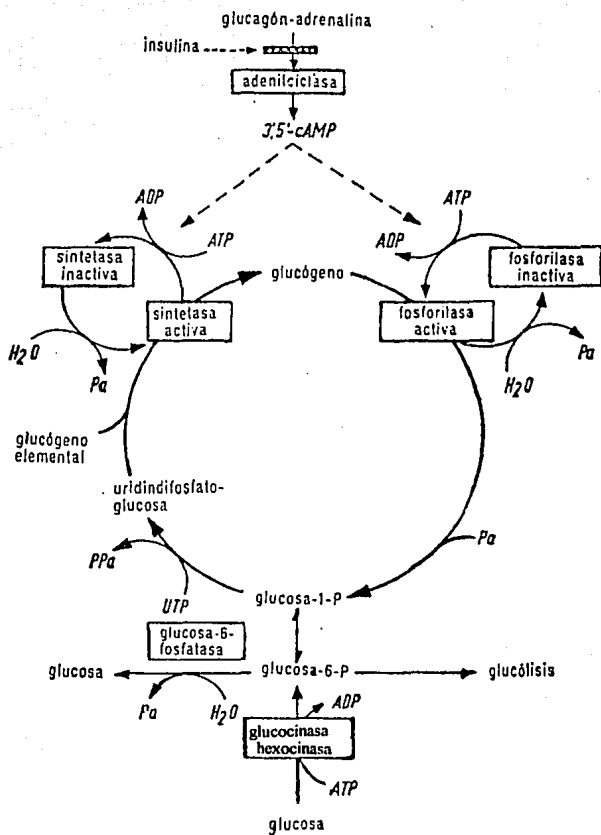


FIGURA 7. Vías enzimáticas de la insulina.

b) aumento de la captación de glucosa de la sangre por células hepáticas al incrementar la actividad de la enzima glucocinasa que causa la fosforilación inicial de la glucosa. Una vez fosforilada la glucosa es atrapada dentro de las células hepáticas.

c) aumento de la actividad de enzimas que promueven la síntesis de glucógeno (fosfofructocinasa y glucógeno sintetasa).

Lo anterior puede aumentar la cantidad de glucógeno en el hígado hasta incrementar en un 5-6% su masa total.

Cuando la glucemia comienza a disminuir hasta un valor bajo, el hígado libera glucosa a la sangre circulante ocurriendo los siguientes fenómenos:

1) el páncreas disminuye la secreción de insulina y por lo tanto se detiene el depósito de glucógeno.

2) La falta de insulina activa la enzima fosforilasa que desdobra el glucógeno en fosfato de glucosa, el cual es transformado por la fosfatasa-glucosa en glucosa libre y de esta forma se difunde a la sangre (43).

La insulina también promueve la conversión de glucosa hepática en ácidos grasos que son posteriormente transportados y depositados como grasa. Además inhibe la gluconeogénesis por dos razones: disminuye la liberación de aminoácidos del músculo y tejido extrahepáticos y reduce la actividad de enzimas hepáticas necesarias para tal fin. La insulina promueve el transporte de glucosa a las células musculares.

La insulina fomenta la formación de proteínas y también impide su degradación. Algunos de los hechos que comprende son:

a) causa el transporte activo de muchos aminoácidos al interior de las células.

b) tiene efecto directo en los ribosomas para aumentar la traducción del RNA mensajero formando en consecuencia nuevas proteínas.

c) durante un periodo prolongado de insulina, aumenta la transcripción del DNA y así forma mayores cantidades de RNA.

d) la insulina inhibe el catabolismo de las proteínas disminuyendo la degradación por los lisosomas (43).

La insulina estimula el crecimiento del cuerpo y de las glándulas salivales y endócrinas ya que se incrementa la síntesis de RNA, promoviendo la síntesis de enzimas y proteínas estructurales (45).

La acción hipoglicémica de la insulina es equilibrada por la acción de las hormonas del lóbulo anterior de la hipófisis y de la corteza suprarrenal. La hormona del crecimiento estimula la secreción de insulina, pero un exceso causa hiperglucemia.

Metabolismo Anormal de la Glucosa

El descenso permanente de la tolerancia a la glucosa es causado por alteraciones del metabolismo normal de la misma. Hay disminución de la utilización hepática y tisular de la glucosa, además, la gluconeogénesis hepática y la neogluconeogénesis a partir de proteínas y ácidos grasos están aumentadas (ver figura 8) (41).

Los criterios del National Diabetes Data Group para diagnosticar diabetes se presentan a continuación:

- * Glucosa plasmática en ayunas: mayor de 140 mg/dl por lo menos en dos ocasiones.
- * Prueba de la tolerancia a la glucosa oral (1.75 g de glucosa/ kg de peso corporal: máximo 75 g)
 - a. diabetes mellitus: glucosa plasmática mayor o igual a 200 mg/dl a las dos horas y en otro punto más en la prueba.
 - b. tolerancia a la glucosa alterada: glucosa plasmática entre 140 y 200 mg/dl a las dos horas y mayor de 200 mg/dl entre la hora cero y dos horas.
 - c. diabetes gestacional: dos o más valores mayores de:
 - ayunas - 105 mg/dl
 - 1 hora - 190 mg/dl
 - 2 horas - 165 mg/dl
 - 3 horas - 145 mg/dl

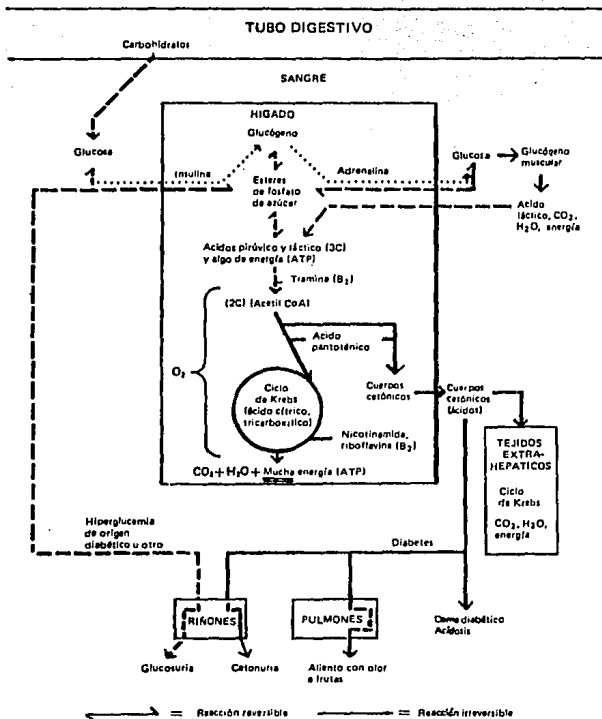


FIGURA 8. Metabolismo de la glucosa en condiciones fisiológicas normales y en diabetes mellitus.

1.3 INFLAMACION

La lesión de las células suscita una reacción protectora inmediata de los tejidos vecinos llamada inflamación. Es uno de los procesos patológicos más frecuentes que se encuentran en medicina (25).

Se define como la reacción de los tejidos vivos a todas las formas de lesión; comprende respuestas vasculares, neurológicas, humorales y celulares en el sitio de la lesión (8).

Durante mucho tiempo se consideró que la inflamación se caracterizaba por cuatro signos: "calor", "tumor", "rubor" y "dolor" (46). Se atribuye erróneamente a Galeno un quinto signo: "pérdida de la función" (46), debiéndose a Magno el descubrimiento de origen de tal signo (Rudolf Virchow) (47). Sólo después que John Hunter estableció que el proceso inflamatorio es de carácter protector (25), otros adelantos demostraron que muchos tipos de inflamación no comparten todos los signos "clásicos" (48).

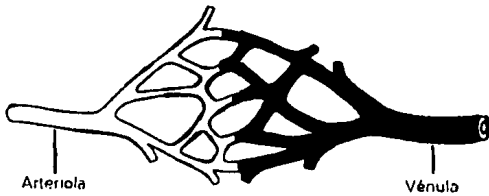
Cualquiera que sea la causa, las células en el sitio de la lesión se dañan y las sustancias químicas provenientes de estas células inician la inflamación (25). Todos los elementos que integran los tejidos conectivos vascularizados participan y por la tanto, cuanto más complicado sea el tejido, más complejo será el cuadro del proceso inflamatorio.

La inflamación comprende dos tipos de respuestas, la respuesta aguda y la respuesta crónica. La primera es una reacción inmediata y temprana a un agente lesivo, caracterizada principalmente por cambios vasculares y exudativos. En contraste, la respuesta crónica se origina por estímulos lesivos persistentes; origina infiltración de células mononucleares y proliferación de fibroblastos. Quizás siga a la inflamación aguda o la respuesta pueda ser crónica casi desde el inicio (8).

Los fenómenos de la inflamación son complejos y deben considerarse como un cuadro cambiante y dinámico (9).

La sangre circula en dos corrientes: una central (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) y otra periférica (plasma) (49-51). Siempre que las células o los tejidos experimentan lesión o destrucción se desencadena una serie integrada de fenómenos. En un momento dado los vasos del área reducen su diámetro (9), pero en corto tiempo se restablece el flujo sanguíneo por dilatación arteriolar pudiendo continuar durante períodos prolongados (hasta 24 horas) manteniéndose elevado el volumen y la presión, transmitiéndose la pulsación arteriolar a capilares y vénulas (ver figura 9 y 10). Este cambio vascular ocasiona que al poco tiempo se torne más lento el flujo sanguíneo (estasis) (25) que se detienen por completo.

NORMAL



INFLAMADO



FIGURA 9. Alteraciones del flujo sanguíneo en la inflamación.

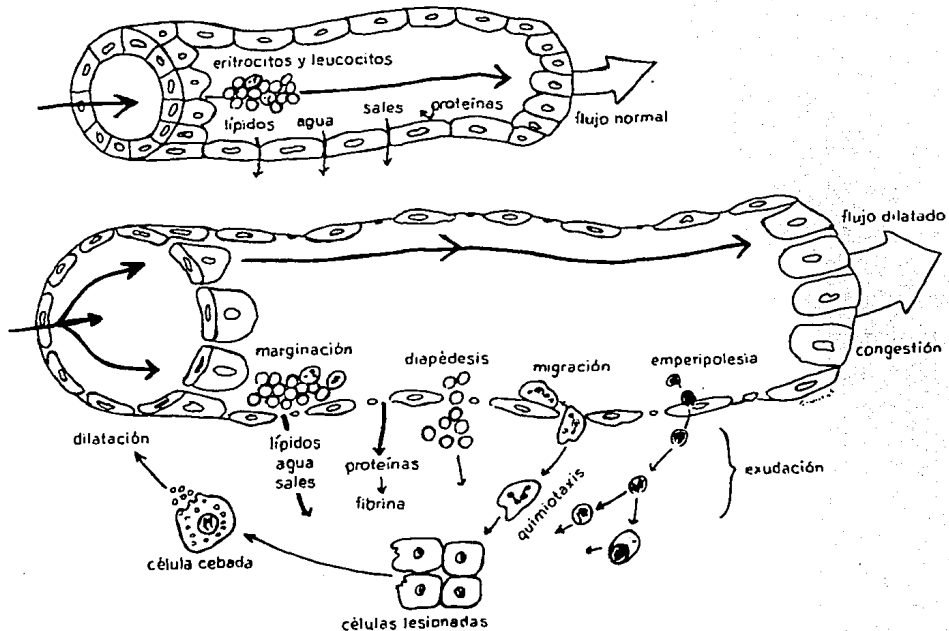


FIGURA 10. Esquema que muestra las primeras fases de la inflamación, dilatación vascular, intercambio de líquido y paso de células hacia el área lesionada.

Las dos zonas de flujo intercambian sus lugares, de modo que las células de la corriente central son desplazadas hacia la periférica (25). Debido a la vasodilatación se crean espacios libres entre las células endoteliales y aumenta la permeabilidad vascular (este concepto se aplica al paso de coloides, iones, electrolitos y agua). Cuando la agresión es leve, el aumento de permeabilidad es inmediato y de muy poca duración; cuando la lesión del tejido es más severa se observa la fase inmediata y en poco tiempo (alrededor de 15 minutos) hay un aumento progresivo y persistente de la permeabilidad, prolongándose 24 horas o más (25). Como consecuencia de este aumento de permeabilidad hay salida de sales, lípidos, agua y proteínas hacia el intersticio de los tejidos y se permite una mayor difusión de líquido y células (9).

Existen mediadores químicos como por ejemplo la histamina, serotonina, prostaglandinas, etc., que alteran la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Un mediador químico es cualquier sustancia endógena cuya concentración aumenta en el sitio del traumatismo inflamatorio, en asociación con la aparición de por lo menos una respuesta o cambio estructural del tejido (52).

El paso siguiente es la migración de células debido al mecanismo denominado diapédesis(25). Las primeras células que aparecen en el intersticio son los neutrófilos; en las siguientes 24 a 48 horas emigran los monocitos; 4 o 5 días después de la lesión inicial se encuentran los macrófagos. Las últimas células en aparecer son los linfocitos. La atracción de estas células hacia el área se debe a un factor químico liberado por las células lesionadas, proceso llamado quimiotaxis.

La dirección de movimiento de las células está determinado por las sustancias que se encuentran en el medio (53). Los tejidos en el sitio lesionado son separados al ocurrir edema el cual proviene del plasma de la sangre y contiene fibrinógeno que a su vez es convertido en fibrina (9).

El líquido intercelular con sus abundantes proteínas de la sangre y partes de las zonas lesionadas se denomina exudado. Existen varios tipos de exudado según el producto predominante:

- * Serosos
- * Purulentos
- * Fibrinosos
- * Hemorrágicos
- * Membranosos (9)

La reacción inflamatoria se modifica por muchos factores, entre los que se encuentran los siguientes:

- a) potencia y cuantía del agente lesivo
- b) duración de la exposición
- c) capacidad invasora
- d) susceptibilidad de los microorganismos a la fagocitosis y la digestión
- e) estado fisiológico del paciente
- f) localización de la lesión (46)

1.4 REPARACION Y REGENERACION

En la reacción de inflamación y de reparación, ésta última empieza poco después de la lesión, mientras que aún está en su apogeo la reacción inflamatoria aguda, pero no puede completarse sino hasta que el agente lesivo ha sido destruido o neutralizado (54).

La capacidad de reparación, aunque universal, varía ampliamente y depende de la especie, tejido, edad, irritantes, estímulos locales, irrigación sanguínea y movilidad de los tejidos (22).

Si un tejido lesionado es reemplazado por células similares o idénticas a las destruidas hablamos de regeneración (22). La regeneración se clasifica en tres tipos:

- * Regeneración fisiológica
- * Regeneración compensatoria
- * Regeneración patológica

La regeneración fisiológica se conoce también como renovación celular, la cual es necesaria para el recambio normal. La regeneración compensatoria aparece en órganos pares y la regeneración patológica se produce cuando hay pérdida repentina de tejidos epiteliales (55).

La reparación es un término global que incluye la regeneración. Existen dos tipos de reparación: a) la reparación por regeneración parenquimatosa (25) que consiste en la sustitución del área lesionada con el mismo tejido que precedió la inflamación y b) la reparación por tejido conectivo que restablece la continuidad morfológica además de sustituir funciones especiales, ocasionando agotamiento de la reserva funcional de un órgano o tejido (54).

La reparación con tejido conectivo se considera tradicionalmente de dos tipos:

- 1) como unión primaria o de primera intención si ocurre por oposición adecuada en los bordes de una herida quirúrgica mediante puntos de sutura y,
- 2) como unión secundaria o de segunda intención si ocurre cuando la pérdida de tejido evita esta oposición.

En el primer caso hay poca pérdida de sustancia o no la hay; el exudado y los restos necróticos son mínimos y la reparación es muy rápida. Sin embargo, en el segundo caso hay una pérdida importante de tejidos (como en heridas abiertas); existe una cantidad considerable de exudado y restos necróticos que deben eliminarse, originando lo anterior, una reparación lenta (56).

En la fase inicial de la reacción de reparación, el espacio de la incisión es ocupado por un coágulo de fibrina y eritrocitos para la solución de continuidad creada por la herida. Tiempo después aparece edema seguido por la salida de neutrófilos, los cuales emigran hacia la superficie destruida, deshidratándose la superficie del coágulo originando la costra que protege al tejido conectivo hasta que éste pueda prepararse. Continúa así la inflamación aguda con infiltrado de polimorfonucleares (25); después la epidermis en los labios de la herida se engrosa debido a la migración de elementos epiteliales desde los bordes al coágulo (25,51) y por último se origina la formación de puentes fibrosos. De los bordes del coágulo sobresalen prolongaciones de las células epiteliales hacia la línea media y producir una capa epitelial delgada, restableciendo así la continuidad epidérmica (25). Posteriormente aparecen los macrófagos (20) que limpian los restos necróticos y eliminan eritrocitos y fibrina. Otra de las funciones del macrófago consiste en la secreción de factores químicos que favorecen la migración de fibroblastos hacia el sitio lesionado (ver figura 11). Los fibroblastos sintetizan y secretan componentes de la matriz extracelular (colágena tipo I y III) (25,20).

El espacio de la incisión comienza a ser ocupado por yemas capilares originando engrosamiento de la capa de revestimiento epidérmico (tejido de granulación) (57), además se incrementa la duplicación fibroblástica de manera que las fibrillas de colágena comienzan a ser más abundantes y van de un lado a otro de la incisión. Durante este periodo, la epidermis recupera su grosor normal (8). A lo largo de dos semanas, la acumulación de colágena es continua (destacándose el tipo I) y llega a su máximo a los 2 o 3 meses de originada la lesión (55).

Factores que influyen en la reacción inflamatoria y reparadora

Se han clasificado a los agentes que modifican la curación de las heridas en influencias generales e influencias locales.

Influencias generales

- * La nutrición del paciente. Observaciones clínicas indican que la disminución de proteínas alteran la reparación de las heridas.
- * Las alteraciones de la sangre pueden tener un gran efecto sobre la reacción inflamatoria y reparadora, ya que una deficiencia de elementos celulares hace que ciertos procesos se tornen inadecuados.
- * La diabetes mellitus es un factor predisponente, ya que los diabéticos tienden a desarrollar infecciones clínicas y tienen menor capacidad para controlar la invasión microbiana. Tienden a sufrir además, riego sanguíneo inadecuado hacia la zona dañada.
- * Las hormonas. Las concentraciones altas de cortisol impiden la vasodilatación y la permeabilidad vascular. También interfieren con la quimiotaxis.

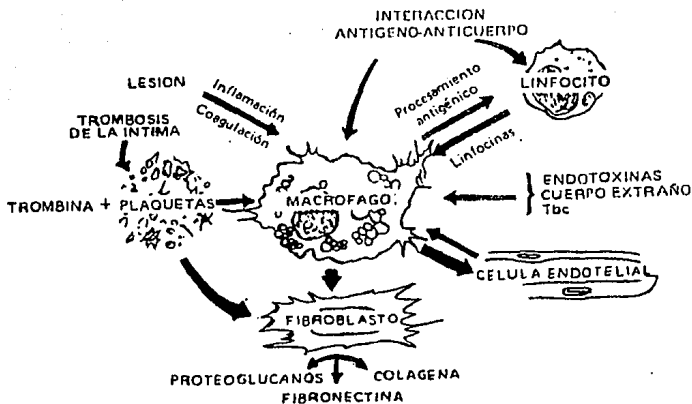


FIGURA 11. Esquema actual de la Biología Celular de la reparación de las heridas. Obsérvese el papel central que probablemente tiene el macrófago. Aparentemente, el leucocito polimorfonuclear desempeña un papel reservado a la defensa contra las infecciones. Es probable que exista una linfocina que estimule directamente la fibroplasia.

Influencias locales

La insuficiencia del aporte sanguíneo local puede ser de las más importantes. La infección es un impedimento para la reparación. Los cuerpos extraños son estímulos muy claros para la inflamación e impiden la reparación. La localización de la lesión, puede alterar importantemente el resultado final (55).

1.5 ARGININA

La L-arginina (ácido-alfa-amino-gamma-guanidin-valeriánico) es considerado como semiesencial ya que puede ser sintetizado por los mamíferos pero no en cantidades suficientes para su máximo desarrollo, por lo que se tiene que ingerir en dieta normal (58).

Se metaboliza mediante dos mecanismos:

a) la desaminación oxidativa, proceso por el cual se conserva el radical guanidínico y se utiliza en la síntesis de creatinina.

b) la hidrólisis enzimática por medio de la enzima arginasa en el ciclo de la urea con formación de ornitina y urea (59). Krebs y Henseleit encontraron que la velocidad de formación de la urea a partir de amoníaco se aceleraba al añadir ornitina, citrulina o arginina (ver figura 12) (1).

La arginina participa directamente en la formación de tejido conectivo. Se ha estudiado además la influencia de un suplemento de arginina sobre el crecimiento y la reparación de heridas incisionales en piel. La L-arginina produjo un aumento en el depósito de colágena en el área específica de la herida. Esto concluye que la arginina juega dos papeles en la reparación de heridas: es esencial para la síntesis de colágena y disminuye algunos de los aspectos negativos de la respuesta metabólica en la lesión (60).

Este aminoácido interviene en la compactación del DNA ya que forma parte de las histonas y protaminas. La función de la arginina en las histonas es la de dar carga positiva a estas proteínas de pH neutro y de esta forma se pueda combinar con el DNA cargado negativamente (ver figura 13) (61).

En estudios previos se demostró que la L-arginina estimula la producción de insulina (3), interviniendo en la biosíntesis de ésta, ya que forma parte del péptido C en los residuos 31,32 y 65, los cuales son lugares donde se desarrolla la hidrólisis por tripsinas del péptido para la liberación de insulina, en las últimas fases de la síntesis de ésta. Se ha comprobado una levación de los niveles de péptido C después de la infusión con arginina en pacientes diabéticos en diferentes estados de evolución (61).

La infusión de arginina (5 m M/t) en ratas diabéticas (estreptozotocina), incrementó la secreción de insulina debido a la hipersensibilidad de las células β a la estimulación con arginina, siendo ésta dependiente de la dosis administrada (62).

Se cree además que el potasio causa la liberación de insulina abriendo los canales de calcio sensibles a los cambios de voltaje. La arginina cierra estos canales de las células α estimulando la producción de insulina e inhibiendo la de glucagon (63).

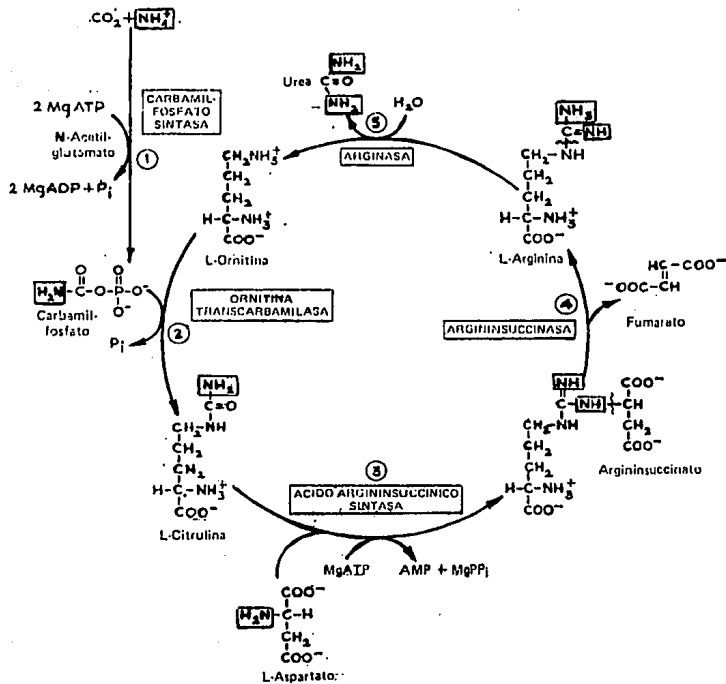


FIGURA 12. El ciclo de la Urea consta de 5 enzimas. Las enzimas 1 y 2 son mitocondriales y 3, 4 y 5 son citoplasmicas.

METABOLISMO DE LA L-ARGININA

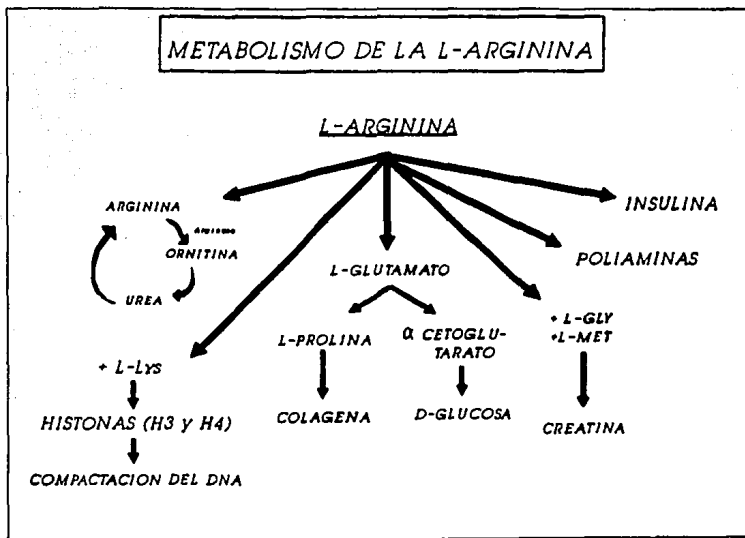


FIGURA 13. La arginina es utilizada en diferentes vías metabólicas.

Es posible que la L-arginina sea metabolizada dentro de las células β de los islotes de Langerhans, ya que se ha comprobado 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 (64).

La respuesta de insulina a la L-arginina disminuye con la edad y es independiente al secretagogo utilizado. Lo anterior se relaciona con la actividad de la enzima glicerofosfato deshidrogenasa y al avance en la producción del estado diabético (65).

La arginina en grandes concentraciones (mayores de 500mg/mg de peso corporal) produce daños en el páncreas, los cuales incluyen la desorganización progresiva y degeneración del retículo endoplásmico rugoso de las células acinares y una reducción en el número de zimógenos. Se han observado daños en organelos como las mitocondrias y membranas granulares. Se observan además células acinares necróticas, con signos de daño celular irreversible como pignosis y cariorexixis (66).

1.6 ARGINASA

La arginasa (L-arginina amino hidrolasa, E.C. 3.5.3.1.) es la enzima que cataliza la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina y urea (67).

Fue descubierta y descrita por Losel y Dakin en 1904 y se detectó en hígado de mamíferos como enzima terminal del ciclo de la urea, mecanismo que tiene lugar en organismos ureotélicos y fue postulado por H. Krebs en 1932 (2), lo que indica que es esencial para la realización de procesos básicos de la función celular (68).

Esta enzima está presente 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. La actividad de la arginasa se ha demostrado en diferentes tejidos de mamíferos: riñón (69), placenta (70,71), corazón (72), sangre (73); eritrocitos (74-81), linfocitos y granulocitos leucémicos (82), en líneas de células tumorales en cultivo (83), en suero (84,85), así como en los factores de suero regidos por la inducción de arginasa en macrófagos (86). En ratas se ha detectado la actividad de arginasa en glándulas submaxilares, bazo, corazón, piel, etc. (87). Además, en un estudio reciente se determinó la actividad de esta enzima en los diferentes estadios del crecimiento y desarrollo de la pulpa dental humana (88).

Se atribuye a la arginasa como función principal la conversión de L-arginina en urea y ornitina, siendo además un precursor de la prolina, del ácido glutámico y la citrulina (88).

La arginasa posee una estructura oligomérica, siendo un tetrámero que consta de 4 monómeros. Su rango de pH está entre 9.3 y 10. Esta enzima hidroliza enlaces C-N no peptídicos y tiene afinidad por el sustrato arginina (89).

Entre la variedad de iones metálicos que activan o estabilizan a las arginasas de diferentes tejidos se encuentran Mn^{++} , Ca^{++} , Ni^{++} e inclusive Fe^{+++} . Por lo tanto, el tratamiento con ácido dietilamino tetracético (EDTA), ocasiona la inhibición de la arginasa por remoción de Mn^{++} (90).

Hunter, et al. (91), reportaron que la actividad de arginasa de hígado bovino se reduce cuando están presentes hidrolizados de proteína, lo que conduce a la inhibición de la enzima. Esta inhibición puede ser completamente reversible con la adición de Mn^{++} en el medio. En este estudio se demostró además que los inhibidores competitivos de arginasa fueron la ornitina y prolina y los inhibidores no-competitivos fueron los aminoácidos isoleucina, valina y cisteína (92).

Arginasa en heridas

La arginasa juega un papel importante en la reparación de heridas. Seifer, et. al., mostraron que la adición de arginina a la dieta de animales lesionados da como resultado un incremento en el depósito de colágena. El patrón cambiante en las concentraciones de arginina en heridas sugieren la actividad de arginasa (93).

Eldbacher y Merz en 1927, describieron la actividad de arginasa en el tejido de granulación y propusieron que un descenso de arginina en el microambiente ocurre en los sitios de inflamación al activarse dicha enzima. Por ello, la actividad de arginasa fue determinada en heridas en donde se encontró una elevada actividad de esta enzima en tejido lesionado (94).

En diferentes modelos de heridas experimentales, se obtuvo como común denominador la presencia de infiltrado celular en el sitio de la inflamación, constituido por leucocitos, linfocitos y fibroblastos que mostraban bajos niveles de arginasa, sin embargo, los macrófagos (otros componentes del infiltrado) mostraron actividad intensa de arginasa. De esta manera se tiene que los macrófagos dentro de las heridas son los responsables de la actividad extracelular de arginasa en tejido lesionado. Con lo anterior se concluye que los macrófagos tienen un papel principal en el metabolismo de arginina en heridas. El objetivo principal es que los productos del catabolismo de arginina dados por las células dentro de la herida, dan origen a los precursores necesarios en la síntesis de colágena (95).

John T. Kung (96) encontró en estudios realizados en células de bazo en un medio rico en macrófagos una disminución significativa de arginina y un incremento marcado de la actividad de arginasa.

Leivovich y Ross demostraron que al paralizar a los macrófagos con un suero antimacrófago, los procesos de migración y proliferación de macrófagos y formación de tejido conectivo sufrieron un retraso importante, lo que sugiere que el macrófago desempeña un papel importante que precede a la aparición de fibroblastos en las heridas. Se demostró que al ser estimulada la fagocitosis de los macrófagos con partículas de látex y después de extraerlos de este medio y agregar al mismo los fibroblastos, se observó que estos se estimulaban hacia una fase de crecimiento y proliferación, lo que sugirió que la activación de los macrófagos produjo un componente que estimuló este crecimiento (97). Lo anterior condujo a una serie de experimentos en los que Yoshio Tsukamoto, et al., descubrieron que la activación de los macrófagos por numerosas enzimas, provoca la liberación de monocimas que causan la migración de fibroblastos in vitro y producen la síntesis y secreción de fibronectina que sirve como un estímulo quimiotáctico para los fibroblastos (98).

Van Elsen y Leroy (72) compararon algunas propiedades cinéticas y cromatográficas de la arginasa de fibroblastos cultivados con las enzimas del hígado y eritrocitos humanos.

Las enzimas que catalizan la conversión de citrulina a arginina en el ciclo de la urea, han sido estudiadas también en fibroblastos cultivados por varios investigadores (98). Cuando los fibroblastos se cultivan en un medio libre de suero, la actividad de arginasa varía con la edad de los mismos. La senectud de las células se acompaña de un decremento en la actividad de arginasa y cambios en el perfil enzimático (69).

1.7 COLAGENA

La colágena es una proteína que aparece como fibra rígida e insoluble en todos los órganos (44).

Los primeros estudios demostraron que la molécula de colágena era muy grande y que poseía una peculiar composición de aminoácidos, comprobándose que alrededor de un tercio son de glicina y un 20% son de prolina e hidroxiprolina (99).

Se consideraba antiguamente que la colágena era una proteína única cuya composición de aminoácidos se había conservado en el curso de la evolución. Sin embargo, los métodos analíticos han llevado al descubrimiento de diferencias en la secuencia de aminoácidos en las cadenas alfa de la colágena, considerándose ahora como una familia de moléculas estrechamente relacionadas pero genéticamente distintas (100).

Las moléculas de colágena son largas (aproximadamente 300 nm) y estrechas (unos 2nm). Cada molécula está compuesta por 3 cadenas de polipéptidos anudados en la forma de una hélice triple llamadas cadenas alfa y están formadas por secuencias repetitivas de 3 aminoácidos (101). Esta estructura se forma por la presencia de glicina en cada tercer residuo. La torsión dentro de las cadenas se da con una vuelta hacia la izquierda y los grupos prolilo e hidroxiprolilo están acomodados en una triple hélice sin distorsión y estabilizan las estructuras (ver figura 14) (44).

Dentro del 20% que constituyen prolina e hidroxiprolina (102), más de 1 de cada 5 del total son prolinas y la mitad de éstas aparece modificada por hidroxilación en posición 4 y una cantidad mucho menor está hidroxilada en la posición 3 del anillo (ver figura 15) (1).

Estas hidroxiprolinas se encuentran principalmente en la colágena. Una pequeña porción aparece en la elastina, y en la enzima acetil colinesterasa. En general el contenido de hidroxiprolina en los tejidos es un indicador del contenido de colágena (44).

La hidroxilación de la prolina es causada por la vitamina C, que mantiene a la enzima prolina-hidroxilasa en estado activo, por lo que una inadecuada cantidad de esta vitamina da manifestaciones clínicas que incluyen un deterioro de tejido que resulta notable en las encías, incluso los dientes pueden aflojarse de sus alveolos, debido a la degeneración del colágena en los ligamentos periodontales. Una complicación ulterior es la disminución de la capacidad de reparación. Con la presencia de los grupos de hidroxiprolina, es posible predecir si un tipo de célula dado posee el potencial de producir colágena, determinando si produce una enzima que puede hidroxilar la prolina (101).



FIGURA 14. La colágena está formada por tres cadenas polipeptídicas. Cada cadena está torsionada hacia la izquierda, con una vuelta cada tres residuos, y las tres cadenas están enroscadas entre sí formando una hélice derecha en la cual por cada diez vueltas de las cadenas individuales hay una vuelta de la triple hélice. La colágena de tipo I contiene un par de cadenas de un mismo tipo y una tercera cadena diferente, como se muestra en la figura; otros tipos de colágena poseen tres cadenas idénticas.

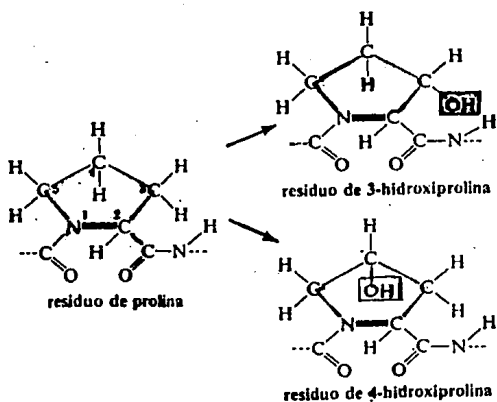


FIGURA 15. Los residuos de prolina pueden ser hidroxilados en las posiciones 3 y 4.

Se han descrito 5 tipos diferentes de colágena, cada uno de los cuales posee su combinación particular de cadenas alfa constituyentes y se sabe de la existencia de otros tipos de colágena. Las principales distribuciones histológicas de estos tipos de colágeno se enlistan en el cuadro II (101).

En la colágena tipo I (que es característica de los tejidos blandos, cicatrices, hueso, dentina y el resto de tejido conectivo normal), hay una diferencia en la composición y secuencia de aminoácidos entre una cadena alfa y las otras dos. Cada molécula de los otros tipos está compuesta por 3 cadenas alfa idénticas. No obstante, en ciertos tejidos, la tipo V parece estar constituido por dos clases de cadenas alfa.

Biosíntesis de la colágena

Los aminoácidos que integran la colágena resultan de una serie de reacciones bioquímicas que parten del catabolismo de la L-arginina que origina prolina e hidroxiprolina. La biosíntesis de estos aminoácidos se esquematiza en la figura 16. Un incremento en las concentraciones de arginina aumenta la biosíntesis de estos aminoácidos (103). Una vez sintetizada la prolina e hidroxiprolina, se dirigen hacia los ribosomas para ahí sujetarse a reacciones de peptidización, glucosilación e hidroxilación, originando la preprocolágena (2).

La colágena se sintetiza inicialmente en los fibroblastos, como preprocolágena. Más tarde, el segmento señal o guía de 70 aminoácidos se separa del extremo N-terminal para producir procolágena. Es sólo de esta forma, de cadena única, en que los residuos de prolina y lisina, pueden modificarse por hidroxilación a hidroxiprolina. Después de agregar residuos de glucosa y galactosa a algunos de estos oxhidrilos, las 3 cadenas se retuercen juntas con la glicina que aparece cada tercer residuo en el interior. La hélice es transportada al aparato de Golgi donde se añaden otros carbohidratos a los extremos de la molécula y se forman puentes disulfuro. De esta manera la procolágena se transporta al exterior de la célula. Sólo en el espacio intersticial se escinden grandes segmentos de ambos extremos (incluyendo todos los puentes disulfuro) y la tropocolágena resultante se ensambla en fibras de colágena (ver figura 17) (58).

Influencia de la Diabetes en la producción de colágena

La diabetes mellitus está asociada con un defecto generalizado en el metabolismo del tejido conectivo (104). Los defectos en el tejido conectivo en diabetes se caracterizan por una acumulación de este tejido en otros tejidos (piel y membranas vasculares) (11), y por el decremento del tejido conectivo en tejido óseo y en heridas (105,106).

CUADRO II. Distribución y origen de los cinco tipos de colágeno

tipos de colágeno	Distribución histológica principal	Células de origen
I	Tejido conectivo laxo y normal denso; fibras colágenas Cartilago fibroso Hueso Dentina	Fibroblastos y células reticulares; células del músculo liso Osteoblastos Odontoblastos
II	Hialina y cartilago elástico Cuerpo vítreo del ojo	Condrocitos Células de la retina
III'	Téjido conectivo laxo; fibras reticulares Copa papilar de la dermis Vasos sanguíneos	Fibroblastos y células reticulares Células del músculo liso; células endoteliales
IV	Membranas basales Cápsula del cristalino del ojo	Células epiteliales y endoteliales Fibras cristalinas
V	Membranas fetales; placenta Membranas basales Hueso Músculo liso	Fibroblastos Células del músculo liso

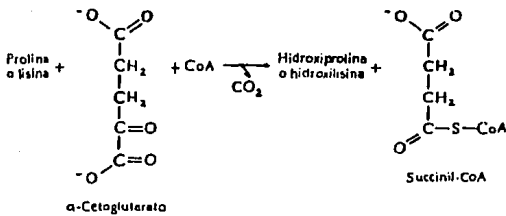
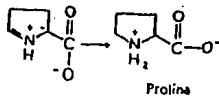
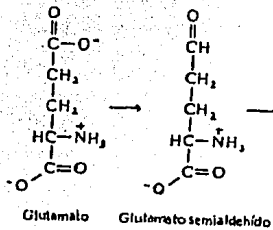
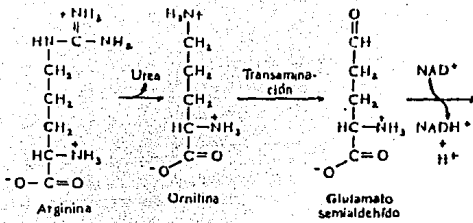


FIGURA 16. Biosíntesis de prolina e hidroxiprolina.

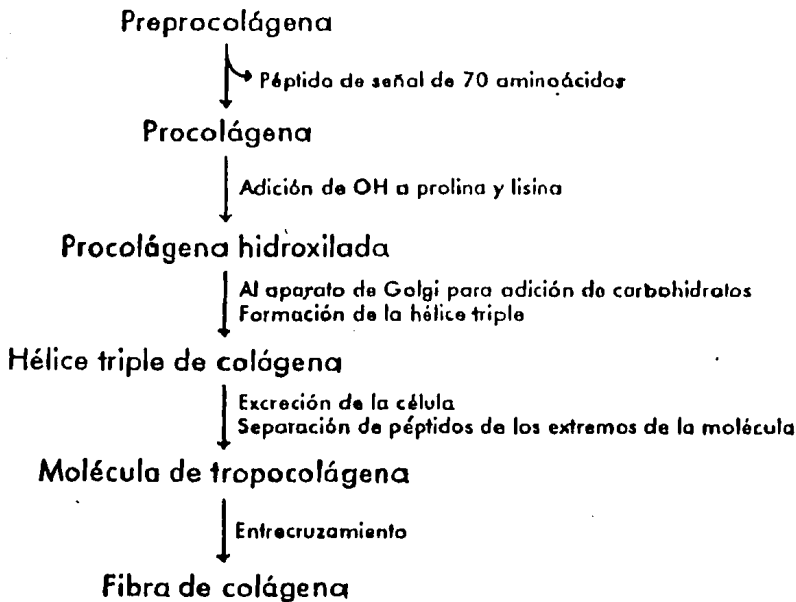


FIGURA 17. Maduración de la colágena.

En fibroblastos dérmicos de niños diabéticos se encontró que la síntesis de los elementos del tejido conectivo disminuyeron notablemente (99). En estudios previos se encontró que la colágena de tejidos en crecimiento disminuyó en animales diabéticos (107). Spanheimer (13), comprobó que existe un factor en el suero diabético que inhibe la producción de colágena. Este factor desaparece con la presencia de insulina.

Se han llevado a cabo estudios de reparación de heridas en animales diabéticos tratados con estreptozotocina y se ha confirmado una disminución en la fuerza tensional y un descenso en la producción de colágena (15).

Las enfermedades crónicas del peridonto y mucosa bucal en general están influenciadas por factores sistémicos que involucran estados hormonales y metabólicos. La patología relacionada entre las enfermedades bucales y la diabetes mellitus es conocida. El tejido diabético se ve afectado en su integridad ya que los fibroblastos producen una baja en la síntesis de colágena originando inflamaciones crónicas en pacientes diabéticos (108).

CAPITULO 2. MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

2.1 Material Biológico

Para la realización de los experimentos se utilizaron 32 ratas adultos machos Sprague-Dawley proporcionadas por el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS) con un rango de peso entre 240 a 300 g.

2.2 Material básico

- * Pinza de disección con dientes
- * Pinza de mosco
- * Jeringas para insulina (1ml)
- * Gasas y pañuelos desechables
- * Cristalería en general

2.3 Reactivos básicos

- * Solución inyectable de Droperidol (2.5 mg/ml)
- * Solución inyectable de Ketamina (50 mg/ml)
- * Buffer TRIS - HCl
- * Aloxana

2.4 Material químico y aparatos analíticos

Para el análisis químico de la actividad de arginasa, peso seco, proteínas, DNA y L-hidroxiprolina se utilizaron los materiales y reactivos de los procedimiento descritos más adelante.

Para la determinación de glucosa se empleó: Glucómetro GX para diagnóstico de Bayer.

2.5 Procedimientos de laboratorio

Los animales se mantuvieron en el Bioterio bajo condiciones estándar alimentados con purina y agua ad libitum, con periodos de luz de 12 horas.

Se dividieron en 4 lotes de 8 ratas cada uno, y se agruparon como sigue:

- LOTE I Ratas normales tratadas con solución de L-arginina (10mM)
- LOTE II Ratas normales (Control)
- LOTE III Ratas diabéticas tratadas con solución de L-arginina (10mM)
- LOTE IV Ratas diabéticas (Control)

Se utilizó el lote II como control para verificar la reparación normal y el lote IV para ver la influencia del estado diabético en la misma.

Se les indujo diabetes a los animales de los lotes III y IV inyectando aloxana (i.p.) a una concentración de 120 mg/kg de peso (109), disuelta en solución salina (0.9%).

Todos los lotes se anestesiaron con 0.4 ml de solución inyectable de droperidol y 0.6 ml de solución inyectable de ketamina por vía intramuscular. En los lotes III y IV después de inducida la diabetes se les practicó una incisión quirúrgica de 1 cm de largo en la mucosa bucal, del mismo modo que a los lotes I y II.

Posteriormente cada lote fue tratado de la siguiente manera:

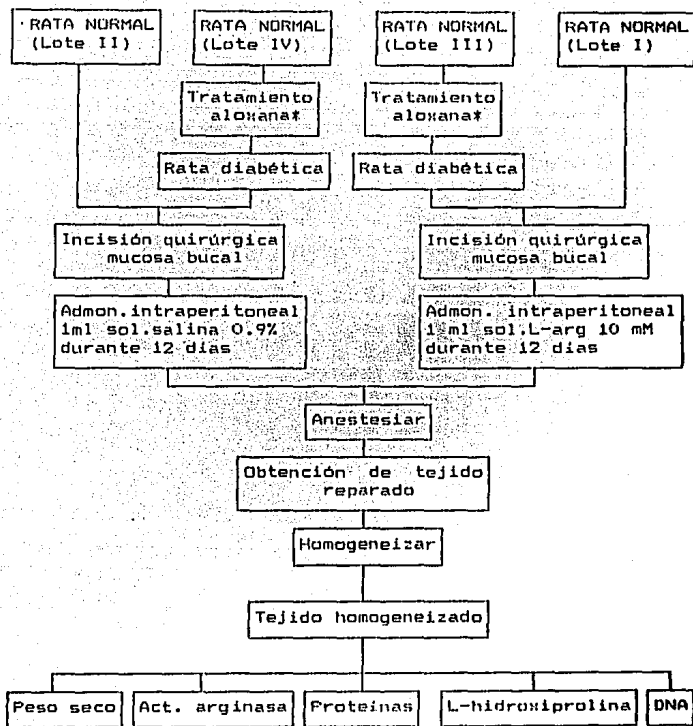
Lote I. Se le trató con 1.0 ml de solución de L-arginina 10 mM por vía intraperitoneal durante 12 días.

Lote II. Recibió 1.0 ml de NaCl (0.9%) por vía intraperitoneal en dosis diarias durante 12 días.

Lote III Recibió 1.0 ml de solución de L-arginina 10 mM durante 12 días vía intraperitoneal.

Lote IV. Se le administró por vía intraperitoneal 1.0 ml de solución salina al 0.9% durante 12 días.

Durante este periodo clínico todos los lotes se mantuvieron bajo observación. Diariamente a los lotes III y IV se les determinó glucosa en sangre. Al término de 12 días se procedió al sacrificio y a la obtención del tejido en el sitio donde previamente se realizó la herida, colocándolo en tubos de ensayo que contenían Buffer Tris-HCl 40 mM. A continuación se procedió a eliminar el exceso de agua colocándolo sobre un papel filtro para pesarlo. El tejido así tratado se homogeneizó en Buffer Tris-HCl y se realizaron las siguientes determinaciones: peso seco, actividad de arginasa, proteínas, DNA y L-hidroxiprolina.



* Aloxana 120 mg/kg de peso

Diagrama de flujo que resume el procedimiento experimental.

PESO SECO

Determinación rápida del peso seco por colorimetría (110)

FUNDAMENTO:

Es un método colorimétrico rápido y preciso para la determinación del peso seco de muestras biológicas. Consiste en hacer reaccionar a éstas con una solución ácida de dicromato de potasio a temperatura ambiente durante 20 minutos, a continuación se determina la densidad óptica a 630 nm.

Este método requiere un mínimo de tiempo para la determinación, tiene una mayor sensibilidad, exactitud y precisión. Es insensible a compuestos inorgánicos y se puede aplicar a homogeneizados de tejidos preparados en soluciones inorgánicas. La única desventaja parece ser 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 1

1 gr de dicromato de potasio
50 ml de H_2SO_4
Calentar a 70°C

2. Solución estándar de manitol 2mg/ml

APARATOS

- * Parrilla eléctrica
- * Espectrofotómetro
- * Vortex mixer

PROCEDIMIENTO

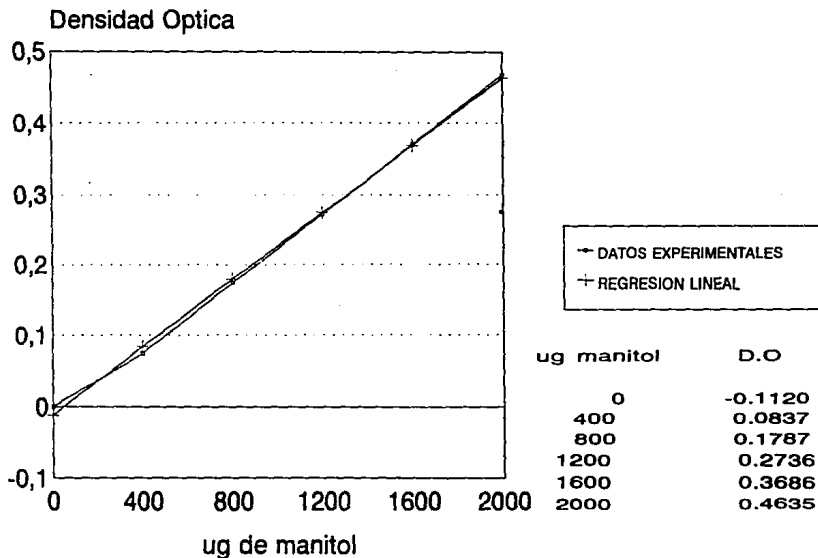
Se toman 50 μ l de homogeneizado y se completa a 1000 μ l con agua destilada. Posteriormente se agregan 2000 μ l de la solución 1, se mezclan y se deja reaccionar 15 minutos. Se lee la absorbancia a 660 nm.

Las muestras, el blanco y la curva estándar se procesan por duplicado.

La cantidad de peso seco se reporta como :

μ g peso seco / μ g peso húmedo.

CURVA ESTANDAR PESO SECO



PROTEINAS

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Lowry con modificaciones (111).

FUNDAMENTO

Desde que fue propuesto el uso del reactivo de folin para la determinación de proteínas, se han reportado numerosas modificaciones analíticas en cuanto al procedimiento de utilización.

Se han estudiado las peculiaridades y limitaciones de este reactivo en cuanto a efectos a diferentes pH, tiempo de reacción, concentración de reactivos y sustancias que interfieren.

Existen dos reacciones que originan el color final de la proteína: La reacción con el cobre en álcali y la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por la proteína tratada con el cobre.

REACTIVO

1. Solución 1:

- carbonato de sodio 2%
- tartrato doble de sodio y potasio al 0.02%
- hidróxido de sodio 0.1N

2. Solución 2:

- solución al 0.05 % de sulfato de cobre pentahidratado en agua destilada

3. Solución 3:

Se mezclan 50 volúmenes de la solución 1 con un volumen de la solución 2 al momento de usarse.

4. Reactivo de folin-ciocalteu (diluido en agua 1:2).

5. Solución estándar de albúmina bovina 0.2 mg/ml

APARATOS

- * Espectrofotómetro
- * Centrifuga
- * Vortex mixer

PROCEDIMIENTO

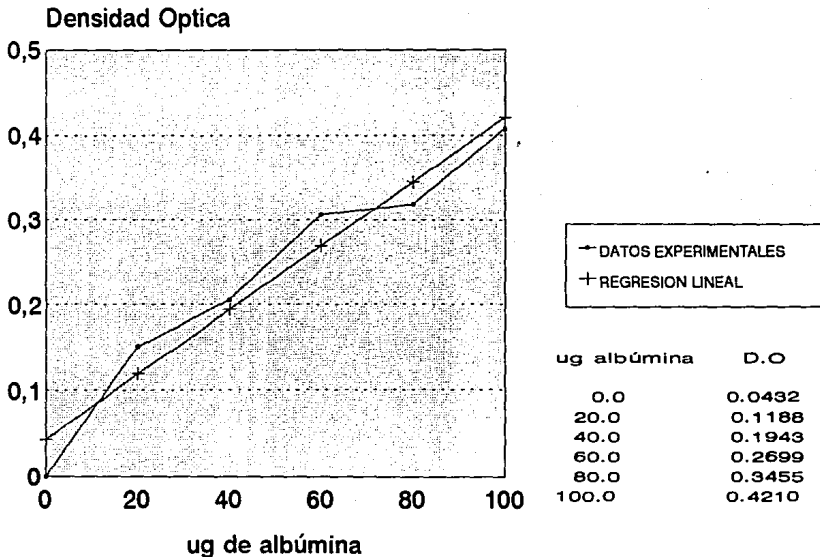
Se toman 50 μ l de homogeneizado y se agregan 450 μ l de hidróxido de sodio 1N, se incuba a 37°C durante 30 minutos. Se centrifuga 8 minutos a 3000 rpm y se toma una alícuota de 500 μ l del sobrenadante, se agregan 2000 μ l de la solución 3 y se deja reposar durante 10 minutos. Se agregan después 200 μ l del reactivo de folin y se deja reposar por 20 minutos. Se lee la absorbancia a 530 nm.

Las muestras, blanco y curva estándar se hacen por duplicado.

La unidad en la que se reporta la cantidad de proteínas en tejido es:

μ g de proteína / μ g de peso seco

CURVA ESTANDAR PROTEINAS



ACTIVIDAD DE ARGINASA: (112)

Determinación de la actividad de arginasa.

FUNDAMENTO:

La actividad de arginasa se ha establecido por mediciones de:

- a) una disminución de la concentración de arginina
- b) un incremento de la concentración de ornitina
- c) un incremento en la concentración de urea.

En este caso se mide la cantidad de urea producida por acción de la enzima.

Este método utiliza la tiosemicarbazida y diacetil monoxima en medio ácido.

La aparición del color depende del tiempo y de la temperatura de calentamiento.

REACTIVOS

1. Diacetilmonoxima 415.5 mg/100ml
2. Tiosemicarbazida 5.0 mg
3. Reactivo colorido: se mezclan 3500 μ l del reactivo 1 con 5 mg del reactivo 2, aforando todo a 25 ml con agua bidestilada.
4. Cloruro férrico 0.12 M en ácido fosfórico 56.7%
5. Acido sulfúrico al 20%
6. Reactivo ácido : se mezclan 25 μ l del reactivo 4 con 25 ml del reactivo 5
7. Solución estándar de urea 0.0150 mg/ml

APARATOS

- * Termo-block
- * Parnilla eléctrica
- * Vortex mixer
- * Espectrofotómetro

PROCEDIMIENTO

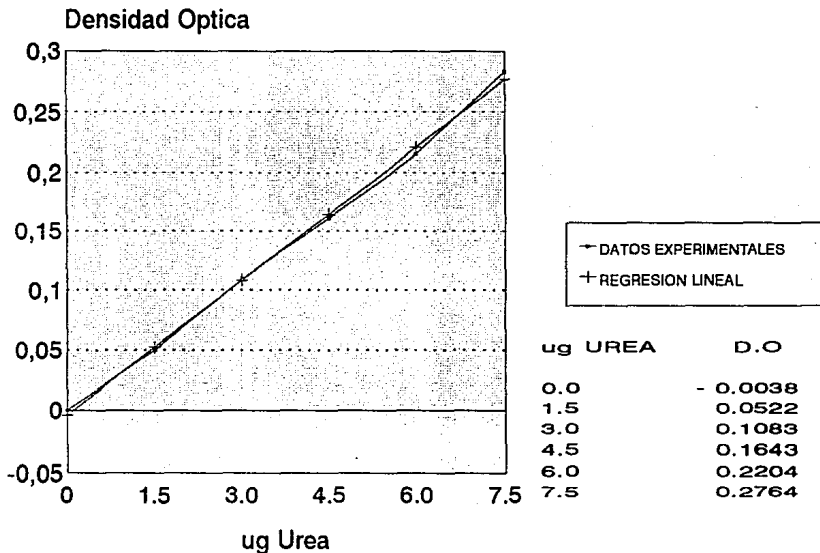
Se toman 50 μl del homogeneizado y se agregan 450 μl de buffer (MgCl_2 0.002 M en Tris-HCl 40 mM y solución salina 0.9%, a un pH 7.5). Se incuba a 55°C durante una hora y se toma del sobrenadante una alícuota de 400 μl y se le agregan 100 μl de una solución de arginina (0.4 M) - glicina (0.15 M). Se incuba a 37°C por 15 minutos e inmediatamente después se pone en baño de agua hirviendo 7 minutos.

Se toman alícuotas de 300 μl y se completan hasta obtener 1000 μl con agua destilada, se agrega a estas muestras 1000 μl del reactivo colorido y 2000 μl del reactivo ácido. Posteriormente se mezclan y se cierran los tubos, calentándolos a 92°C durante 20 minutos y se dejan enfriar para después leer la absorbancia a 530 nm.

La actividad de arginasa se reporta como:

μg de urea/ μg de proteína/ minuto

CURVA ESTANDAR UREA



HIDROXIPROLINA

Determinación espectrofotométrica del hidroxiprolina con modificaciones (113)

FUNDAMENTO

Desde que se estableció el uso de este método se han realizado una serie de modificaciones para ahorrar reactivos y tiempo, al igual que se ha modificado para su aplicación en la determinación de otros aminoácidos asociados con la colágena.

Las pruebas realizadas para la modificación del método originaron las siguientes observaciones:

Siempre se necesita un exceso de reactivo de ninidrina y aún así hay formación de color; si hay exceso de agua el complejo colorido no se forma. En ausencia de agua se forma un complejo colorido (rosa). Con HCl 6 N, en el reactivo de ninidrina, en vez de ácido fosfórico no se forma coloración.

Las modificaciones al método de Chinard son:

- a) tomar las respectivas cantidades de solución estándar de hidroxiprolina y hacerlas reaccionar con 1 ml de ninidrina concentrada (3100 ug/ul).
- b) la solución de ninidrina se emplea con ácido fosfórico 6 M y ácido acético glacial.
- c) la solución estándar se disuelve en ácido acético.
- d) La muestra problema debe tratarse con acetona y alcohol absoluto para tenerla en estado anhidro y la prueba no se vea alterada por la presencia de agua.

REACTIVOS

1. Acido clorhídrico 6 N
2. Acetona
3. Etanol absoluto
4. Acido acético glacial
5. Reactivo A: 4 ml de ácido fosfórico 6 M en 6ml de ácido acético glacial y 0.031 g de ninidrina.
6. Solución estándar de L-hidroxiprolina 10 µg/ml en ácido acético.

APARATOS

- Termo-block
- Centrifuga
- Vortex mixer
- Mechero Bunsen
- Espectrofotómetro

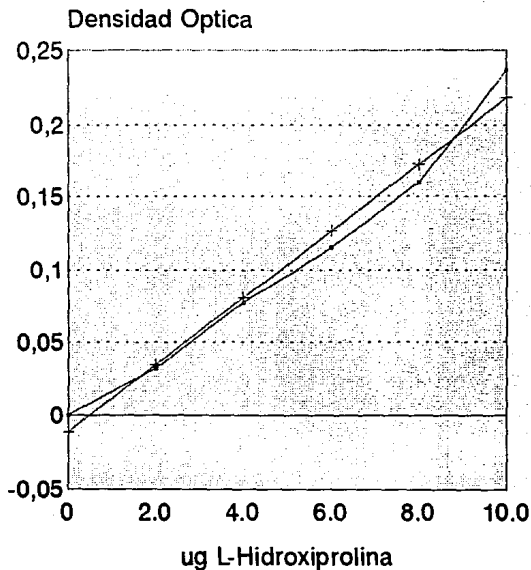
PROCEDIMIENTO

Tomar 100 μ l de homogeneizado y agregar 100 μ l de HCl 6 N, incubando a 70°C durante 16 horas. Se centrifuga a 4500 rpm 15 minutos y se toma una alícuota de 100 μ l de hidrolizado ácido, después de lo cual se agregan 50 μ l de acetona y se evapora a sequedad. El residuo se lava 3 veces con 200 μ l de etanol absoluto en cada lavado, recolectándose los extractos etanólicos. Se evapora a sequedad el etanol y el residuo se recoge con 1000 μ l de ácido acético y se agregan 1000 μ l del reactivo A. Calentar los tubos en baño de agua hirviendo durante 30 minutos y leer la absorbancia 530 nm.

La cantidad de hidroxiprolina se reporta como:

μ g hidroxiprolina / μ g peso seco

CURVA ESTANDAR L-HIDROXIPROLINA



— DATOS EXPERIMENTALES
+ REGRESION LINEAL

ug L-HP	D.O
0.0	- 0.0112
2.0	0.0346
4.0	0.0805
6.0	0.1264
8.0	0.1723
10.0	0.2182

DNA

Determinación de DNA (114).

FUNDAMENTO

La reacción entre la ribosa y la difenilamina, es probablemente la más usada para la determinación del DNA. Dische describió este método que utiliza una mezcla de ácido sulfúrico, difenilamina y ácido acético. Burton en 1956 (115) propuso una modificación a este método basado en la adición de acetaldehído, y señala que esta determinación es 3.5 veces más sensible que el método original descrito por Dische. En 1965, Giles y Myers (114) publicaron una modificación al método de Burton que lo hace aun más específico, estos autores encontraron que puede reducirse la lectura del blanco omitiendo el ácido sulfúrico e incorporando el acetaldehído al final de la reacción, aunque después mencionan que esto no es requisito indispensable. Comunicaron también que la sensibilidad del método es incrementada al aumentar la concentración de difenilamina al 4%.

REACTIVOS

1. Reactivo 1: Acido perclórico 0.5 M (4°C)
2. Reactivo 2: Acido periclórico 2 M
3. Reactivo 3: Acetaldehído. Se prepara una solución de 16 mg/ml, la cual se mantiene congelada y al momento de usarse se diluye 1:10 con agua destilada.
4. Reactivo 4. Difenilamina. Se prepara una solución al 4% en ácido acético glacial (al momento de usarse).

APARATOS

- * Centrifuga
- * Vortex mixer
- * Termo-block
- * Espectrofotómetro

METODO

Se toman 100 μ l del homogeneizado y se agrega 100 μ l del reactivo 1, se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos. posteriormente se elimina el sobrenadante, se adicionan 100 μ l del reactivo 2 y se incuba a 70°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se centrifuga a 4500 rpm por 20 minutos. Se toman 100 μ l de la fracción ácida y se llevan a un volumen final de 500 μ l con el reactivo 2, adicionando 50 μ l del reactivo 3 y finalmente 500 μ l de la solución de difenilamina, se mezclan y se tapan los tubos, dejando incubar a 37°C durante un lapso de 18 a 24 horas. Se lee posteriormente la absorbancia a 600 nm.

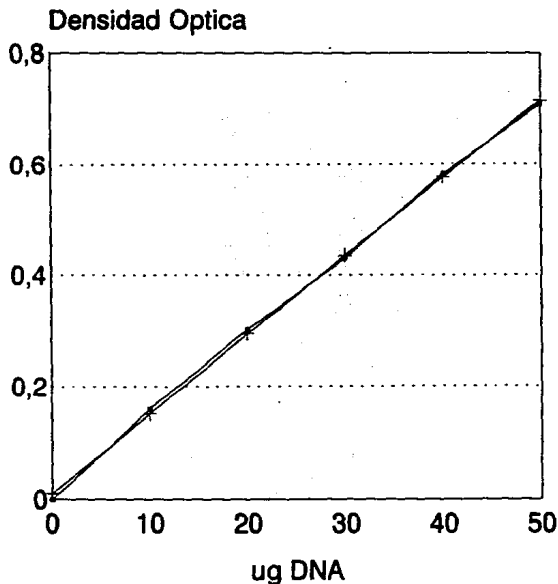
Curva estándar

Se prepara una solución patrón de DNA conteniendo 1mg/ml , la cual se hidroliza a 70°C durante 30 minutos, y se guarda congelada hasta el momento de usarse; al utilizarse se diluye 1:10 para tener una concentración final de 0.1 mg/ml . Se toman alícuotas adecuadas (100-500 μ l) para obtener concentraciones de 10 a 50 μ g por sistema.

La unidad en la que se reporta la cantidad de DNA en el tejido es:

$$\mu\text{g DNA} / \mu\text{g Peso seco}$$

CURVA ESTANDAR DNA



→ DATOS EXPERIMENTALES

+ REGRESION LINEAL

ug DNA	D.O
00	0.0104
10	0.1516
20	0.2927
30	0.4339
40	0.5750
50	0.7161

CAPITULO 3. RESULTADOS

3.1 Resultados (Tablas y gráficas)

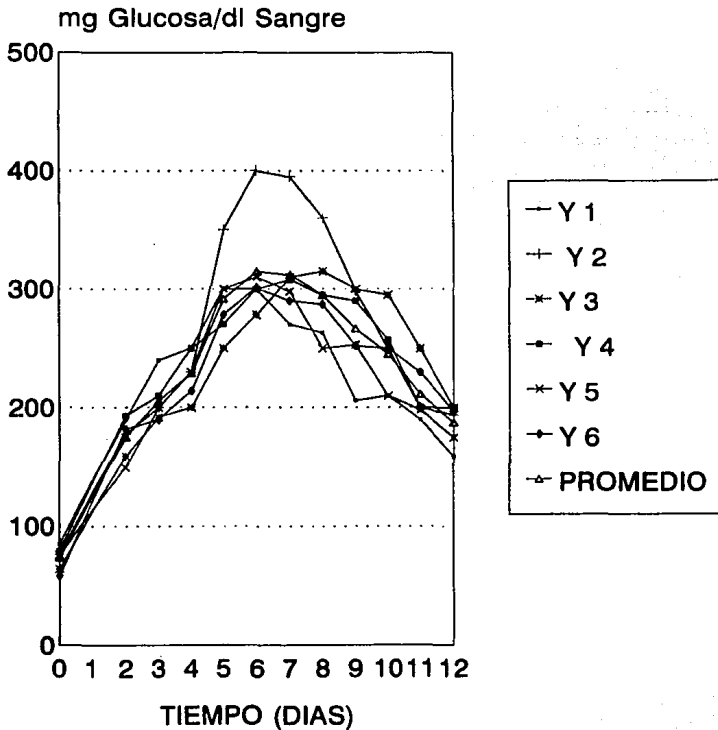
Al concluir la realización del modelo experimental, se obtuvieron los siguientes resultados que pueden dividirse en dos grupos:

- a) Curvas de Glucosa**
- b) Determinaciones bioquímicas**

CURVAS DE GLUCOSA mg / dl							
LOTE III (DIABETICO -ARGININA)							
X(DIAS)	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	PROMEDIO
0	85	76	64	79	76	58	73.66
1							
2	190	178	159	193	150	182	175.33
3	240	200	192	210	200	190	205.33
4	250	230	200	250	230	214	229.00
5	300	350	250	270	300	278	291.33
6	300	400	278	300	310	301	314.83
7	270	395	310	308	298	290	311.83
8	283	380	315	295	250	287	295.00
9	208	298	300	290	253	252	266.50
10	210	250	295	257	210	250	245.33
11	190	200	250	200	198	230	211.33
12	159	194	200	200	175	197	187.50
LOTE IV (DIABETICO)							
X(DIAS)	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	PROMEDIO	
0	89	75	70	75	85	78.80	
1							
2	158	140	150	185	180	162.60	
3	170	189	175	200	190	184.80	
4	175	200	180	204	196	191.00	
5	190	208	200	209	204	202.20	
6	205	230	210	230	250	225.00	
7	207	250	250	250	259	243.20	
8	250	300	300	300	300	290.00	
9	300	370	350	350	375	349.00	
10	400	400	400	375	400	395.00	
11	400	400	400	400	390	398.00	
12	375	390	395	400	400	392.00	

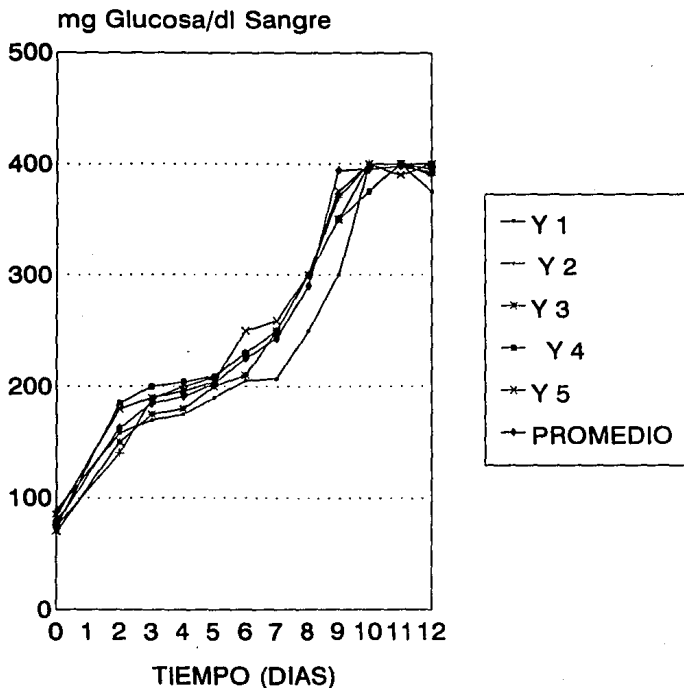
CURVA DE GLUCOSA mg/dl

LOTE III (DIABETICO-ARGININA)



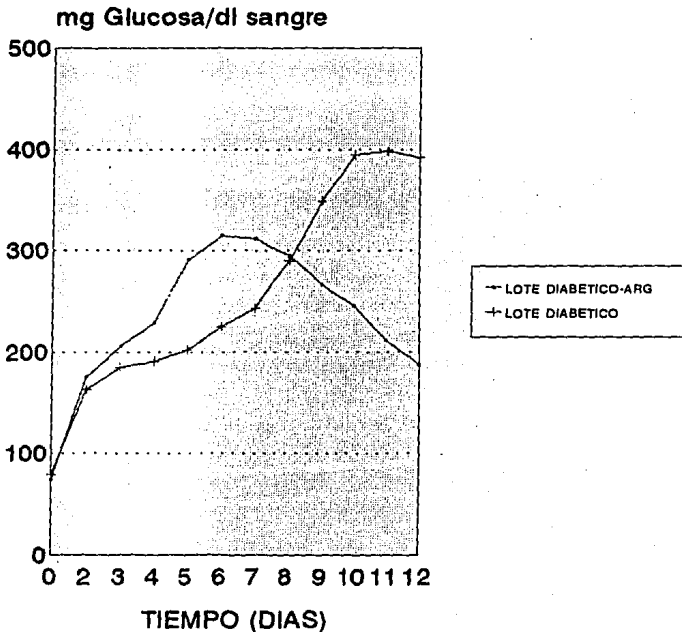
CURVA DE GLUCOSA mg/dl

LOTE IV (DIABETICO)



CURVA DE GLUCOSA

COMPARACION DE LOTES



LOTE DIABETICO (IV) Y LOTE DIABETICO + ARGININA (III)

A continuación se presentan los resultados de las determinaciones bioquímicas realizadas a cada uno de los lotes especificados en el modelo experimental.

El tratamiento de cada uno de los lotes fue el siguiente:

Lote I Normal con L-arginina

Lote II Normal (Control)

Lote III Diabético con L-arginina

Lote III Diabético (Control)

**DETERMINACIONES
BIOQUIMICAS**

RESULTADOS

PESO SECO

<i>MUESTRA</i>	<i>LOTE I</i>	<i>MUESTRA</i>	<i>LOTE II</i>
1	0.3406ug PS/ug PH	1	0.2848 ug PS/ug PH
2	0.3327ug PS/ug PH	2	0.2772 ug PS/ug PH
3	0.3100ug PS/ug PH	3	0.2753 ug PS/ug PH
4	0.3615 ug PS/ug PH	4	0.3049 ug PS/ug PH
5	0.3447 ug PS/ug PH	5	0.2857 ug PS/ug PH
6	0.4218 ug PS/ug PH	6	0.2830 ug PS/ug PH
7	0.4054 ug PS/ug PH	7	Muerte
8	Muerte	8	Muerte
MEDIA	0.3595 ug PS/ug PH	MEDIA	0.2856 ug PS/ug PH

<i>MUESTRA</i>	<i>LOTE III</i>	<i>MUESTRA</i>	<i>LOTE IV</i>
1	0.2804 ug PS/ug PH	1	0.2501 ug PS/ug PH
2	0.2804 ug Ps/ug PH	2	0.2674 ug PS/ug PH
3	0.2703 ug PS/ug PH	3	0.2099 ug PS/ ug PH
4	0.2796 ug PS/ug PH	4	0.2138 ug PS/ug PH
5	0.2788 ug PS/ug PH	5	0.2215 ug PS/ug PH
6	0.2776 ug PS/ug PH	6	Muerte
7	Muerte	7	Muerte
8	Muerte	8	Muerte
MEDIA	0.2779 ug PS/ug PH	MEDIA	0.2325 ug PS/ug PH

PROTEINAS

<i>MUESTRA</i>	<i>LOTE I</i>	<i>MUESTRA</i>	<i>LOTE II</i>
1	0.0894 ug Prot/ug PS	1	0.0738 ug Prot/ug PS
2	0.0918 ug Prot/ug PS	2	0.0725 ug Prot/ug PS
3	0.1048 ug Prot/ug PS	3	0.0775 ug Prot/ug PS
4	0.0778 ug Prot/ug PS	4	0.0661 ug Prot/ug PS
5	0.0875 ug Prot/ug PS	5	0.0684 ug Prot/ug PS
6	0.0862 ug Prot/ug PS	6	0.0718 ug Prot/ug PS
7	0.0870 ug Prot/ug PS	7	Muerte
8	Muerte	8	Muerte
MEDIA	0.0892 ug Prot/ug PS	MEDIA	0.0717 ug Prot/ug PS

MUESTRA	LOTE III	MUESTRA	LOTE IV
1	0.0664 ug Prot/ug PS	1	0.0287 ug Prot/ug PS
2	0.0735 ug Prot/ug PS	2	0.0368 ug Prot/ug PS
3	0.0736 ug Prot/ug PS	3	0.0537 ug Prot/ug PS
4	0.0662 ug Prot/ug PS	4	0.0454 ug Prot/ug PS
5	0.0698 ug Prot/ug PS	5	0.0337 ug Prot/ug PS
6	0.0697 ug Prot/ug PS	6	Muerte
7	Muerte	7	Muerte
8	Muerte	8	Muerte
MEDIA	0.0699 ug Prot/ug PS	MEDIA	0.0397 ug prot/ug PS
ARGINASA			
MUESTRA	LOTE I	MUESTRA	LOTE II
1	0.0081ugU/ugProt*min	1	0.0073ugU/Prot*min
2	0.0079ugU/ugProt*min	2	0.0066ugU/Prot*min
3	0.0077ugU/ugProt*min	3	0.0066 ugU/ugProt*min
4	0.0089ugU/ugProt*min	4	0.0068 ugU/ugProt*min
5	0.0081ugU/ugProt*min	5	0.0073 ugU/ugProt*min
6	0.0085ugU/ugProt*min	6	0.0069 ugU/ugProt*min
7	0.0089ugU/ugProt*min	7	Muerte
8	Muerte	8	Muerte
MEDIA	0.0083ugU/ugProt*min	MEDIA	0.0069 ugU/ugProt*min
MUESTRA	LOTE III	MUESTRA	LOTE IV
1	0.0067ugU/ugProt*min	1	0.0043ugU/ugProt*min
2	0.0065ugU/ugProt*min	2	0.0042ugU/ugProt*min
3	0.0056 ugU/ugProt*min	3	0.0046ugU/ugProt*min
4	0.0062 ugU/ugProt*min	4	0.0043ugU/ugProt*min
5	0.0064 ugU/ugProt*min	5	0.0042ugU/ugProt*min
6	0.0063 ugU/ugProt*min	6	Muerte
7	Muerte	7	Muerte
8	Muerte	8	Muerte
MEDIA	0.0063 ugU/ugProt*min	MEDIA	0.0043ugU/ugProt*min

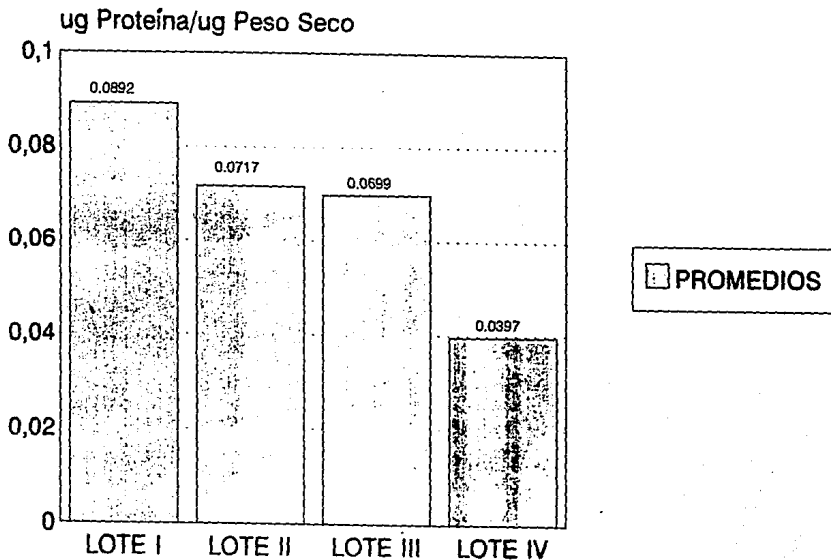
**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

HIDROXIPROLINA			
MUESTRA	LOTE I	MUESTRA	LOTE II
1	0.0078 ugHidroX/ugPS	1	0.0057 ugHidroX/ugPS
2	0.0083 ugHidroX/ugPS	2	0.0056 ugHidroX/ugPS
3	0.0084 ugHidroX/ugPS	3	0.0057 ugHidroX/ugPS
4	0.0085 ugHidroX/ugPS	4	0.0055 ugHidroX/ugPS
5	0.0083 ugHidroX/ugPS	5	0.0056 ugHidroX/ugPS
6	0.0078 ugHidroX/ugPS	6	0.0055 ugHidroX/ugPS
7	0.0084 ugHidroX/ugPS	7	Muerte
8	Muerte	8	Muerte
MEDIA	0.0082 ugHidroX/ugPS	MEDIA	0.0056 ugHidroX/ugPS
MUESTRA	LOTE III	MUESTRA	LOTE IV
1	0.0054 ugHidroX/ugPS	1	0.0037 ugHidroX/ugPS
2	0.0052 ugHidroX/ugPS	2	0.0034 ugHidroX/ugPS
3	0.0048 ugHidroX/ugPS	3	0.0036 ugHidroX/ugPS
4	0.0050 ugHidroX/ugPS	4	0.0035 ugHidroX/ugPS
5	0.0051 ugHidroX/ugPS	5	0.0034 ugHidroX/ugPS
6	0.0050 ugHidroX/ugPS	6	Muerte
7	Muerte	7	Muerte
8	Muerte	8	Muerte
MEDIA	0.0051 ugHidroX/ugPS	MEDIA	0.0035 ugHidroX/ugPS
DNA			
MUESTRA	LOTE I	MUESTRA	LOTE II
1	0.0077 ugDNA/ugPS	1	0.0072 ugDNA/ugPS
2	0.0086 ugDNA/ugPS	2	0.0072 ugDNA/ugPS
3	0.0075 ugDNA/ugPS	3	0.0073 ugDNA/ugPS
4	0.0075 ugDNA/ugPS	4	0.0074 ugDNA/ugPS
5	0.0076 ugDNA/ugPS	5	0.0074 ugDNA/ugPS
6	0.0078 ugDNA/ugPS	6	0.0073 ugDNA/ugPS
7	0.0078 ugDNA/ugPS	7	Muerte
8	Muerte	8	Muerte
MEDIA	0.0078 ugDNA/ugPS	MEDIA	0.0073 ugDNA/ugPS

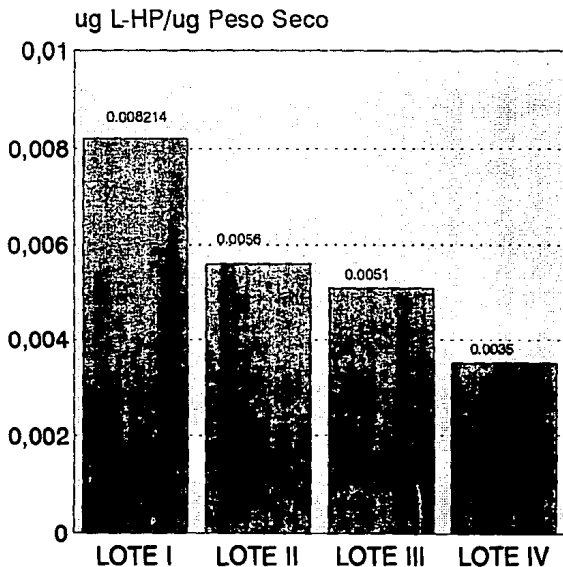
<i>MUESTRA</i>	<i>LOTE III</i>	<i>MUESTRA</i>	<i>LOTE IV</i>
1	0.0069 ugDNA/ugPS	1	0.0056 ugDNA/ugPS
2	0.0063 ugDNA/ugPS	2	0.0063 ugDNA/ugPS
3	0.0065 ugDNA/ugPS	3	0.0057 ugDNA/ugPS
4	0.0065 ugDNA/ugPS	4	0.0057 ugDNA/ugPS
5	0.0067 ugDNA/ugPS	5	0.0060 ugDNA/ugPS
6	0.0066 ugDNA/ugPS	6	Muerte
7	Muerte	7	Muerte
8	Muerte	8	Muerte
MEDIA	0.0066 ugDNA/ugPS	MEDIA	0.0059 ugDNA/ugPS

A continuación se presentan los gráficos que muestran las medias aritméticas de cada una de las determinaciones bioquímicas.

RELACION PROTEINA/PESO SECO

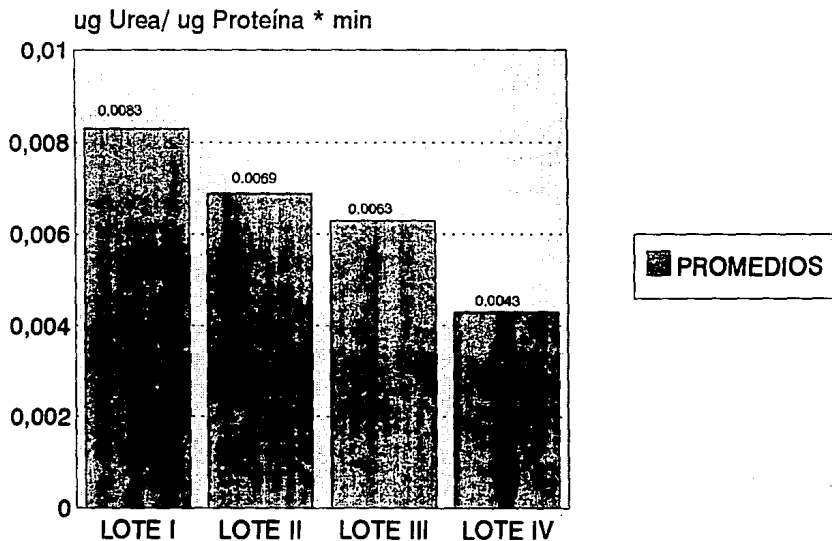


RELACION L-HIDROXIPROLINA/PESO SECO

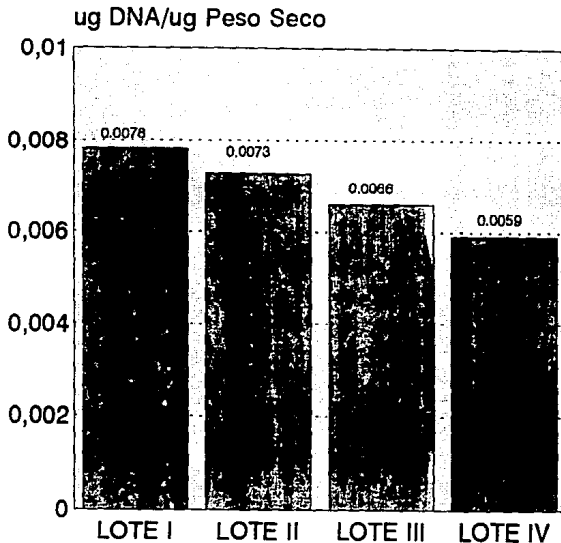


 PROMEDIOS

ACTIVIDAD DE ARGINASA



RELACION DNA/PESO SECO



PROMEDIOS

3.2 Análisis estadístico

En base a los resultados obtenidos en las determinaciones bioquímicas se procedió al análisis estadístico de los mismos para la obtención de conclusiones, empleando para tal efecto el Análisis de Varianza y el Test de Duncan-Kramer de rango múltiple para comparación de medias.

Simbología empleada en el análisis estadístico:

N : número total de muestras

K : número de tratamientos

α : porcentaje de confiabilidad (5%)

i: número de muestra

j: tratamiento

n: tamaño de muestra

x_{ij}: i-ésima observación recibiendo el j-ésimo tratamiento

Σx_{ij} : suma del j-ésimo tratamiento

$\Sigma x_{ij}/n_j$: media del j-ésimo tratamiento

X.. : suma de todas las observaciones

X../N : gran media

g.l : grados de libertad

S.C. : suma de cuadrados

C.M. : Varianza o cuadrados medios

C_{me} : Cuadrados medios (error)

SCR'p : Rango de comparación de Duncan-Kramer

r_p : menor rango significativo

p : subconjunto de medias muestrales

ANALISIS ESTADISTICO

Factor: *Cantidad de Proteinas*

Lote I	Normal + L-arginina
Lote II	Normal (Control)
Lote III	Diabético + L-arginina
Lote IV	Diabético (Control)

$$H_0 = \mu I = \mu II = \mu III = \mu IV = \mu$$

$H_a =$ por lo menos μI en diferencia significativa.

j	I	II	III	IV
1	0.0894	0.0738	0.0664	0.0287
2	0.0918	0.0725	0.0735	0.0368
3	0.1048	0.0775	0.0736	0.0537
4	0.0778	0.0661	0.0062	0.0454
5	0.0875	0.0684	0.0698	0.0337
6	0.0862	0.0718	0.0697	
7	0.0870			

n =		7	6	6	5
$\sum x_j =$		0.6245	0.4301	0.4192	0.1983
$\bar{x}_j =$		0.0892	0.0717	0.0699	0.0397
N =	24				
$X_{..} =$	1.6721				
$\bar{X}_{..} =$	0.2705				
K =	4				

TABLA ANDEVA

PROTEINAS

Fuente de variación	Grados de libertad (g.l.)	Suma de cuadrados (SC)	Varianza o cuadrados medios (CM)	Fcalc	Fteórica
"Entre" Lotes	K - 1 = 4 - 1 = 3	$\sum_{j=1}^K \frac{x_j^2}{n_j} - \frac{x_{..}^2}{N} = \text{SC trat.}$ SC trat = <u>0.00720</u>	$\text{CM trat} = \frac{\text{SC trat}}{K - 1}$ CM trat = <u>0.00240</u>	$F_{\text{calc}} = \frac{\text{CM trat}}{\text{CM error}}$ Fcalc=48	F teórica = F _{1-α, K-1, N-K} = 3.10
Error	N - K = 24 - 4 = 20	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2 - \sum_{j=1}^K \frac{x_j^2}{n_j} =$ SC error SCerror = <u>0.00092</u>	$\text{CM error} = \frac{\text{SC error}}{N - K}$ CMerror = <u>0.00005</u>		
Total	N - 1 = 24 - 1 = 23	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2 - \frac{x_{..}^2}{N} =$ SC total SC total = <u>0.00612</u>			

Debido a que $F_{\text{calc}} > F$ teórica, se rechaza H_0 , encontrando diferencia significativa al 5% entre la cantidad de proteínas de los diferentes lotes. Se empleó para la comparación de medias el test de Duncan de rango múltiple con ajuste de C.Y. Kramer (116,117).

$n_1 = 7$ $C_{me} = 0.00005$
 $n_2 = 6$ $\sqrt{C_{me}} = 0.007071$
 $n_3 = 6$ g.l. = 20
 $n_4 = 5$ $\alpha = 0.05$

\bar{x}_1	\bar{x}_2	\bar{x}_3	\bar{x}_4
0.0892	0.0717	0.0699	0.0397
<u>p</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
rp	2.950	3.097	3.190
SCR'p	0.020859	0.021899	0.022556

Comparaciones

Estadístico para comparar 2 medias poblacionales : $(x_i - x_j)\sqrt{2(n_i n_j)/(n_i + n_j)}$

Comparación	Valor de comparación	p	SCR'p	Conclusión
I - II	0.04448	2	0.20859	I \neq II
I - III	0.04906	3	0.02189	I \neq III
I - IV	0.11950	4	0.02255	I \neq IV
II - III	0.00440	2	0.02085	II = III
II - IV	0.07473	3	0.02189	II \neq IV
III - IV	0.07532	2	0.02085	III \neq IV

Se concluye que el Lote I es significativamente mayor a los lotes II, III y IV y que el lote II es significativamente mayor que el lote IV. Entre los lotes II y III no existe diferencia significativa.

ANALISIS ESTADISTICO

Factor: *Actividad de Arginasa*

Lote I Normal + L-arginina
 Lote II Normal (Control)
 Lote III Diabético + L-arginina
 Lote IV Diabético (Control)

$$H_0 = \mu I = \mu II = \mu III = \mu IV = \mu$$

H_a = por lo menos μI en diferencia significativa.

j	I	II	III	IV
1	0.0081	0.0073	0.0067	0.0043
2	0.0079	0.0066	0.0065	0.0042
3	0.0077	0.0066	0.0056	0.0045
4	0.0089	0.0068	0.0062	0.0043
5	0.0081	0.0073	0.0064	0.0042
6	0.0085	0.0069	0.0063	
7	0.0089			

n =	7	6	6	5
Σx_j =	0.05810	0.04150	0.03770	0.02150
\bar{x}_j =	0.00830	0.006920	0.00628	0.00430
N =	24			
$X_{..}$ =	0.1588			
$\bar{X}_{..}$ =	0.00662			
K =	4			

TABLA ANDEVA

ARGINASA

Fuente de variación	Grados de libertad (g.l.)	Suma de cuadrados (SC)	Varianza o cuadrados medios (CM)	Fcalc	Fteórica
"Entre" Lotes	K - 1 = 4 - 1 = 3	$\sum_{j=1}^K \frac{x_j^2}{n_j} - \frac{x_{..}^2}{N} = \text{SC trat.}$ SC trat = <u>0.00005</u>	CM trat = $\frac{\text{SC trat}}{K - 1}$ CM trat = <u>0.00002</u>	F calc = $\frac{\text{CM trat}}{\text{CM error}}$ Fcalc = 1612.9	F teórica = F _{1-2, K-1, N-K} = 3.10
Error	N - K = 24 - 4 = 20	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2 - \sum_{j=1}^K \frac{x_j^2}{n_j} =$ SC error SC error = <u>1.24 x 10⁻⁶</u>	CM error = $\frac{\text{SC error}}{N - K}$ CM error = <u>6.2 x 10⁻⁸</u>		
Total	N - 1 = 24 - 1 = 23	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2 - \frac{x_{..}^2}{N} =$ SC total SC total = <u>0.000051</u>			

Ya que $F_{cal} > F$ teórica, se rechaza H_0 y se procede a la comparación de medias poblacionales por el test de Duncan de rango múltiple con ajuste de C.Y. Kramer para muestras de tamaño distinto (116,177).

$n_1 = 7$ $C_{me} = 6.2 \times 10^{-8}$
 $n_2 = 6$ $\sqrt{C_{me}} = 0.000249$
 $n_3 = 6$ g.l. = 20
 $n_4 = 5$ $\alpha = 0.05$

	x1	x2	x3	x4
	0.0083	0.00692	0.00628	0.00430
p	2		3	4
rp	2.950	3.097	3.190	
SCR'p	0.000735	0.000771	0.000794	

Comparaciones

Estadístico para comparar 2 medias poblacionales : $(x_i - x_j)\sqrt{2(n_i n_j)/(n_i + n_j)}$

Comparación	Valor de comparación	p	SCR'p	Conclusión
I - II	0.003508	2	0.000735	I \neq II
I - III	0.005135	3	0.000771	I \neq III
I - IV	0.009661	4	0.000794	I \neq IV
II - III	0.001568	2	0.000735	II \neq III
II - IV	0.006119	3	0.000771	II \neq IV
III - IV	0.004624	2	0.000735	III \neq IV

Al nivel de 5% se concluye que cada una de las medias es significativamente diferente entre ellas.

ANALISIS ESTADISTICO

Factor: *Cantidad de Hidroxiprolina*

Lote I Normal + L-arginina
 Lote II Normal (Control)
 Lote III Diabético + L-arginina
 Lote IV Diabético (Control)

$$H_0 = \mu I = \mu II = \mu III = \mu IV = \mu$$

$H_a =$ por lo menos μI en diferencia significativa.

j	I	II	III	IV
1	0.0078	0.0057	0.0054	0.0037
2	0.0083	0.0056	0.0052	0.0034
3	0.0084	0.0057	0.0048	0.0036
4	0.0085	0.0055	0.0050	0.0035
5	0.0083	0.0056	0.0051	0.0034
6	0.0078	0.0055	0.0050	
7	0.0084			

n =	7	6	6	5
$\Sigma x_j =$	0.0575	0.0336	0.0305	0.0176
$x_j =$	0.00821	0.0056	0.00508	0.00352
N =	24			
$X_{..} =$	0.13920			
$X_{..} =$	0.0058			
K =	4			

TABLA ANDEVA

HIDROXIPROLINA

Fuente de variación	Grados de libertad (g.l.)	Suma de cuadrados (SC)	Varianza o cuadrados medios (CM)	Fcalc	Fteórica
"Entre" Lotes	K - 1 = 4 - 1 = 3	$\sum_{j=1}^K \frac{x_j^2}{n_j} - \frac{x_{..}^2}{N} = SC \text{ trat.}$ SC trat = <u>0.00007</u>	$CM \text{ trat} = \frac{SC \text{ trat}}{K - 1}$ CM trat = <u>0.00002</u>	F calc = $\frac{CM \text{ trat}}{CM \text{ error}}$ F calc = 400	F teórica = F _{α, K-1, N-K} = 3.10
Error	N - K = 24 - 4 = 20	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2 - \sum_{j=1}^K \frac{x_j^2}{n_j} =$ SC error SC error = <u>1 x 10⁻⁶</u>	$CM \text{ error} = \frac{SC \text{ error}}{N - K}$ CM error = <u>5 x 10⁻⁸</u>		
Total	N - 1 = 24 - 1 = 23	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2 - \frac{x_{..}^2}{N} =$ SC total SC total = <u>0.00007</u>			

Puesto que $F_{cal} > F$ teórica, se rechaza H_0 , por lo que se concluye que hay diferencia significativa al 5% entre la cantidad de hidroxiprolina para los diferentes lotes. El método empleado para detectar las diferencias entre las medias poblacionales es el test de Duncan de rango múltiple con ajuste de C.Y. Kramer para muestras de tamaño distinto (116,177).

$n_1 = 7$	$C_{me} = 1 \times 10^{-8}$
$n_2 = 6$	$\sqrt{C_{me}} = 0.00010$
$n_3 = 6$	$g.l. = 20$
$n_4 = 5$	$\alpha = 0.05$

x1	x2	x3	x4
0.00821	0.0056	0.00508	0.00362
<u>p</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
rp	2.950	3.097	3.190
SCR*p	0.000295	0.00031	0.000319

Comparaciones

Estadístico para comparar 2 medias poblacionales : $(x_i - x_j) \sqrt{2(n_i - n_j) / (n_i + n_j)}$

Comparación	Valor de comparación	p	SCR*p	Conclusión
I - II	0.006635	2	0.000295	I \neq II
I - III	0.007956	3	0.000310	I \neq III
I - IV	0.011327	4	0.000319	I \neq IV
II - III	0.001274	2	0.000295	II \neq III
II - IV	0.004858	3	0.000310	II \neq IV
III - IV	0.003643	2	0.000295	III \neq IV

Se concluye que el Lote I es significativamente mayor a los lotes II, III y IV y que el lote II es significativamente mayor que el lote IV. Los lotes II y III poseen una diferencia significativa mínima.

ANALISIS ESTADISTICO

Factor: *Concentración de DNA*

Lote I Normal + L-arginina
 Lote II Normal (Control)
 Lote III Diabético + L-arginina
 Lote IV Diabético (Control)

$$H_0 = \mu I = \mu II = \mu III = \mu IV = \mu$$

H_a = por lo menos μI en diferencia significativa.

j	I	II	III	IV
1	0.0077	0.0072	0.0069	0.0056
2	0.0086	0.0072	0.0063	0.0063
3	0.0075	0.0073	0.0065	0.0057
4	0.0075	0.0074	0.0065	0.0057
5	0.0076	0.0074	0.0067	0.0060
6	0.0078	0.0073	0.0066	
7	0.0076			

n =	7	6	6	5
$\Sigma x_j =$	0.05430	0.04380	0.03950	0.02930
$x_j =$	0.00776	0.00730	0.00658	0.00586
N =	24			
$X_{..} =$	0.16690			
$X_{..} =$	0.00695			
K =	4			

TABLA ANDEVA

DNA

Fuente de variación	Grados de libertad (g.l.)	Suma de cuadrados (SC)	Varianza o cuadrados medios (CM)	Fcalc	Fteórica
"Entre" Lotes	K - 1 = 4 - 1 = 3	$\sum_{j=1}^K \frac{x_{.j}^2}{n_j} - \frac{x_{..}^2}{N} = \text{SC trat.}$ SC trat = <u>0.00001</u>	CM trat = $\frac{\text{SC trat}}{K-1}$ CM trat = <u>3.3×10^{-6}</u>	F calc = $\frac{\text{CM trat}}{\text{CM error}}$ F calc = 15.865	F teórica = F _{1-α, K-1, N-K} = 3.10
Error	N - K = 24 - 4 = 20	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2 - \sum_{j=1}^K \frac{x_{.j}^2}{n_j} =$ SC error SC error = <u>4.17×10^{-6}</u>	CM error = $\frac{\text{SC error}}{N-K}$ CM error = <u>2.08×10^{-7}</u>		
Total	N - 1 = 24 - 1 = 23	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2 - \frac{x_{..}^2}{N} =$ SC total SC total = <u>0.000014</u>			

Debido a que $F_{cal} > F$ teórica, se rechaza H_0 encontrando diferencia significativa al 5% entre los lotes estudiados. Se empleó el test de Duncan de rango múltiple con ajuste de C.Y. Kramer para comparación de medias (116,177).

$n_1 = 7$
 $n_2 = 6$
 $n_3 = 6$
 $n_4 = 5$

$C_{me} = 2.08 \times 10^{-7}$
 $\sqrt{C_{me}} = 0.000456$
 $g.l. = 20$
 $\alpha = 0.05$

	x1	x2	x3	x4
	0.00776	0.00730	0.00658	0.00586
	$\overline{p \quad 2 \quad 3 \quad 4}$			
rp	2.950	3.097	3.190	
SCR'p	0.001345	0.001412	0.001455	

Comparaciones

Estadístico para comparar 2 medias poblacionales: $(x_i - x_j)\sqrt{2(n_i n_j)/(n_i + n_j)}$

Comparación	Valor de comparación	p	SCR'p	Conclusión
I - II	0.001169	2	0.001345	I = II
I - III	0.002593	3	0.001412	I \neq III
I - IV	0.004589	4	0.001455	I \neq IV
II - III	0.001764	2	0.001345	II \neq III
II - IV	0.003363	3	0.001412	II \neq IV
III - IV	0.001682	2	0.001345	III \neq IV

Se concluye que hay una diferencia significativa entre el lote I y los lotes II y IV y que no hay diferencia significativa entre los lotes I y II. Entre los lotes II y III existe diferencia significativa mínima.

DISCUSION DE RESULTADOS

En el lote III se observa un incremento constante durante los primeros 7 días en los niveles de glucosa; a partir del octavo día se presentó un descenso significativo, lo que muestra que L-arginina estimula la producción de insulina, siendo este estímulo de la misma naturaleza que el provocado por glucosa, disminuyendo así la glucemia (2,65).

Se presenta un aumento constante en los niveles de glucosa del lote IV alcanzando valores al término del experimento superiores al lote III, lo que corrobora el estado diabético ya que existe una disminución de la utilización hepática y tisular de la glucosa (41).

En los resultados derivados de las pruebas bioquímicas de proteínas, actividad de arginasa, hidroxiprolina y DNA, se muestra una diferencia de medias (117) significativa entre los lotes I-II, I-III, I-IV y II-IV y una diferencia poco significativa entre los lotes III-II.

La elevada concentración de proteínas en el lote I se explica por el suministro de L-arginina ya que este aminoácido participa en la síntesis de proteínas. La mínima cantidad de proteínas en el lote IV se debe a la disminución de insulina ya que ésta tiene un efecto directo en los ribosomas para aumentar la traducción de RNA mensajero formando nuevas proteínas e inhibe el catabolismo de las mismas, disminuyendo la degradación por lisosomas (43). Respecto al grupo III se observa que no hay una diferencia significativa importante con el grupo II, de hecho los valores son prácticamente iguales y esto se debe a dos mecanismos en los que participa la arginina: promueve la síntesis de proteínas y disminuye los niveles de glucosa llevándolos a la normalidad.

En la actividad de arginasa, los valores más elevados se presentan en el lote I y esto se debe a que el incremento en la concentración del sustrato (arginina) de una enzima, aumenta la actividad de la misma (arginasa). Se ha demostrado en estudios realizados por Eldbacher, et al. (94), quienes propusieron que se presenta un descenso de arginina en la herida debido a la activación de esta enzima. En el lote IV se obtuvo una menor actividad de la enzima. En el estado diabético la arginina corporal se dirige hacia el páncreas para estimular la producción de insulina y disminuir la hiperglucemia, dejando al resto del cuerpo con bajos niveles de arginina. Al ocurrir una lesión, la concentración de arginina es baja y por lo tanto la actividad de arginasa disminuye provocando un trastorno en el proceso de reparación. En el lote III, la administración de arginina durante el estado diabético, incrementa la producción de insulina y ésta promueve el transporte de glucosa a las células con tendencia a la normalidad.

Para la determinación bioquímica de hidroxiprolina, se observa que el lote I contiene una elevada cantidad de hidroxiprolina y esto se debe a que un incremento en las concentraciones de arginina, aumentan la biosíntesis de los aminoácidos que integran la colágena (103), por lo tanto la arginina participa directamente en la formación de heridas conectivo, comprobándose su influencia en el crecimiento y reparación de heridas incisionales en piel (60). Las cantidades de hidroxiprolina se presentan disminuidas en el lote IV, esto se debe a que el tejido diabético se encuentra afectado en su integridad ya que los fibroblastos producen una baja en la síntesis de colágena, originando inflamaciones crónicas en pacientes diabéticos (108), debido a un factor presente en el suero diabético que desaparece con la presencia de insulina (13). Al administrar insulina durante el estado diabético (lote III), se presentan dos fenómenos conjuntos: la estimulación de la producción de insulina (64) y aumento de la biosíntesis de aminoácidos que integran la colágena (103). Esto indica que el tratamiento con arginina en el estado diabético fue efectivo en base a que la L-arginina produjo un aumento en el depósito de colágena en el área específica de la herida en la mucosa bucal y al mismo tiempo estimuló la producción de insulina disminuyendo los niveles de glucosa.

En la determinación bioquímica de DNA, la cantidad de éste en el lote I es relevante y esto se debe a que la arginina interviene en la compactación del DNA ya que forma parte de las histonas y protaminas debido a que le proporciona carga positiva a las histonas a pH neutro y de esta forma se pueden combinar con el DNA cargado negativamente (61). En el lote IV, la cantidad de DNA se ve disminuida debido al trastorno crónico y generalizado del metabolismo de las proteínas, aumentándose con esto la degradación proteica (25). La administración de arginina en el lote III origina una producción de insulina, la cual aumenta la transcripción del DNA y así se forman cantidades mayores de RNA (43).

Esto es un paso para el seguimiento del efecto de L-arginina en la reparación de heridas en la mucosa bucal, ya que un aumento en proteínas, hidroxiprolina, actividad de arginasa y DNA, en el estado diabético, da lugar al restablecimiento estructural y funcional de los tejidos en la reparación de heridas bucales, con lo que se confirma la hipótesis planteada.

CONCLUSION

Considerando las severas repercusiones que la diabetes mellitus tiene en el proceso de la reparación de heridas, es importante para el Químico Farmacéutico conocer el efecto farmacológico de la L-arginina en dicho proceso, siendo que:

La L-arginina posiblemente participe en la producción de insulina originando un descenso en la hiperglucemia.

L-arginina, interviene directamente en la biosíntesis de la colágena al ser el precursor de los aminoácidos que lo forman.

Un aumento en la concentración de arginina, incrementa la actividad de arginasa en los macrófagos localizados en la herida, favoreciendo así el proceso reparatorio.

El estado diabético ocasiona anomalías en la reparación de heridas en la mucosa bucal. La L-arginina, al disminuir la glucemia, lleva al organismo a un estado casi normal y de esta forma la reparación se favorece.

Se alcanzó el objetivo propuesto para esta investigación.

BIBLIOGRAFIA

1. Rodríguez, A. C. y Núñez, J. C. : La enzima arginasa: Bioquímica General, Metabolismo. Interés de la determinación sérica en Patología hepática. Revista Clínica Española; Nov., 123(3): 213-219, 1971
2. Hunt, T. K. : Cicatrización e infección de las heridas. Ed. El Manual Moderno, 1a. edición; México, 1983
3. Seifter, E., Rettura, G., Barbul, A. And Levenson, S.: Arginine: An essential amino acid for injured rats. Surgery; 84(2): 224-230, 1978
4. Abramovich, A. : Histología y embriología dentaria. Ed. Mundi, 1a. edición; Argentina, 127-147, 1985
5. Lindhe, J. : Periodontología clínica. Ed. Médica Panamericana, 2a. edición; Argentina, 19-67, 1992
6. Mjör, I. A. and Fejerskov, O. : Embriología e Histología oral humana. Ed. Salvat, 1a. edición; México, 1989
7. McCarthy, P.L. : Enfermedades de la mucosa bucal. Ed. El Ateneo, 1a edición; Argentina, 1985
8. Robbins, S. L., M. D. : Patología Humana. Ed. Interamericana McGraw-Hill, 4a. edición; México, 29-62, 1987
9. Giunta, J. : Patología Bucal. Ed. Interamericana McGraw-Hill , 3a. edición; México, 25-35, 1989
10. Robbins, S. : Patología Estructural y Funcional. Ed. Interamericana, 4a. edición; México, 1987
11. Raskin, P. Maiks, J. F., Burns, H., Plummer, M.D. and Siperstein, M.D. : Capillary basement membrane width in diabetic children. Am J Med; 58: 365-372, 1975
12. Hugoson, A., Thorstensson, H., Flak, H. and Kuylesntierna, J. : Periodontal conditions in insulin-dependent diabetic. J Clin Periodontol; 16: 215, 1989

13. Spanheimer, R. G. : Inhibition of collagen production by diabetic rat serum: Response to insulin and insulin-like growth factor-I added in vitro. *Endocrinology*; 129(6), 1991
14. Cruick, P. J. E. and Foord, R. : A five-year prospective study of 23,649 surgical wounds. *Arch Surg*; 107:206, 1973
15. Goodson, W. H. III and Hunt, T. K. : Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. *J Surg Res*; 22:221, 1977
16. Haeften, T. and Woetberg, G. : Dose-Response characteristics for arginine-stimulated insulin secretion in man and influence of hyperglycemia, *J Clin Endocrinol Metab*; 69: 1059, 1989
17. Borghelli, R. : *Temas de Patología Bucal Clínica*. Ed. Mundi, 1a. edición; Argentina, 1979
18. Geneser, F. : *Histología*. Ed. Panamericana, 1a. edición, México, 392-394, 1989
19. Paulsen, D. : *Histología Básica*. Ed. El Manual Moderno, 1a. edición; México, 1991
20. Werb, A. : *Macrophages in stites D.P. et al (eds) : Basic and Clinical Immunology*. Lange Medical Publications, 5a. edición; Los Altos, 104, 1975
21. Ham, A. : *Tratado de Histología*. Ed. Interamericana, 7a. edición; México, 585-589, 1975
22. Bhaskar, S. N. : *Patología Bucal*. Ed. El Ateneo, 6a. edición; Buenos Aires, 1989
23. Galea, H., Aganovic, I. and Aganovic, M. : The dental caries and periodontal disease experience of patients with early onset insulin dependent diabetes. *International Dental Journal*; 36: 219-224, 1986
24. McCullen, J. A., et al : Microangiopathy within the gingival tissues of diabetic subjects with special reference to the prediabetic stage. *Periodontics*; 5:61, 1967
25. Pérez Tamayo, R. : *Introducción a la Patología*. Ed. Médica Panamericana, 2a. edición; Argentina, 1985

26. Skyler, J. S. And Cahill, G. G. : Simposium on Diabetes mellitus. Am J. Med; 70, Part I (101-102), Part II (325-375), Part III (579-627), 1981
27. Given, B. D., Mako, M. E. and Tager, A. S. : Diabetes due to abnormal insulin. N Engl J Med; 302: 129, 1980
28. Solano, A., Lira, M. A., Sánchez, S. y Martínez, N. J. M. : Características y comportamiento de la diabetes mellitus. Actas Fac Med UAG; 1: 182, 1980
30. Christy, M., Green and Christian, B. : Studies of HLA system and insulin-dependent. Diabetes Care; 2: 209, 1979
31. Yoon, J. W., Austin, M. and Onodera, T. : Virus induced diabetes mellitus, isolation of a virus form the pancreas of a child with keto-acidosis. N Engl J Med; 300: 1173, 1979
32. N. D. D. G. : Clasificación and diagnosis of diabetes mellitus and pregnancy. Diabetes Care; 1:49, 1978
33. West, K.M.: Standarization of definition, clasificación and reporting in diabetes-related epidemiologic studies. Diabetes Care; 2:65, 1979
34. Calig, F. and McDevit, T. : Insulin-Depend diabetic mellitus. The initial lesions. N Eng J Med; 304:1454, 1981
35. Solow, H., Hidalgo, R. and Singai, D.P. : Juvenile-onset diabetes: HLA -A, -B, -C. Diabetes Care; 2:437, 1979
36. Zárate, T. A. : Diabetes Mellitus. Bases para su tratamiento. Ed. Trillas, 1a. edición; México, 10-50, 1979
37. Frankel, N. : Symposium gestional diabetes. Diabetes Care; 3: 399, 1980
38. Mintz, D.H., Skyler, S. and Chez, R. R. : Review of diabetes mellitus and pregnancy. Diabetes Care; 1:49, 1978
39. Colwell, J. A., López Virella, M. and Halushka, P.V. : Review on pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. Diabetes Care; 4: 121, 1981
40. Wheat, L.J. : Review on infection on diabetes mellitus. Diabetes Care; 3: 187, 1980

41. Baron, D. N. : Bioquímica de la Patología Médica. Ed. Toray, S. A., 1a. edición; Barcelona, España, 39-67, 1971
42. Orci, L., Vassalli, J.D. and Perrelet, A. : La fábrica de insulina. Investigación y Ciencia. Scientific American; Nov., 146, 1988
43. Guyton, A. : Insulina, glucagon y diabetes sacarina. Ed. Interamericana McGraw-Hill, 2a. edición; México, 150, 1989
44. McGilvety, R. : Bioquímica. Aplicaciones clínicas. Nueva Editorial Interamericana, 3a. edición; México, 1986
45. Frank, T. Y. and Hsien, S. : Role of insulin in body growth and the growth of salivary and endocrine glands in rats. J Dent Res; 48 (4), 1969
46. Rather, L. J. : Disturbance of function : The legendary fifth cardinal signs of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. Bull N.Y. Acad Med; 47: 303-322, 1971
47. Majno G. : The healing hand : Man and Wound in the Ancient World. Ed. Harvard University Press, 1a. edición; Cambridge, 1975
48. Majno, G. : A brief history of inflammation, in Current Topics in Inflammation and Infection. Ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1a. edición; USA, 1-18, 1982
49. Allison, F. J., Jr., Smith, M. R. and Wood, W. B. , Jr. : Studies on the pathogenesis of acute inflammation I. The inflammatory reaction on thermal injury as observed in the rabbit ear chamber. J Exp Med; 102: 655-668, 1955
50. Bayliss, L. E. : The axial drift to the red cells when blood flows in a narrow tube. J Physiol; 149: 593-613, 1960
51. Wellsn, R. : Rheologic factors in inflammation, in the Inflammatory Process. Zweifach B. W., Grand L. and McCluskey R. t. (eds). New York Academic, 2a, edición; Vol 2, 149-159, 1973
52. Ferreira, S. H. : Prostaglandins, in Houck J.C. (ed): Chemical Messengers of the inflammatory Process. Elsevier North-Holand, 1a. edición; New York, 113-152, 1979

53. Wilkinson, P. C. : Chemostaxis and Inflammation. Churchill Livingstone, 2a. edición; Edingburg, 1982
54. Dunphy, J. E. : The healing of wounds. Can J Surg; 10: 281, 1967
55. Rubin, M. : Patología. Ed. Médica Panamericana, 1a. edición; México, 1991
56. Sussman, M. D. : Aging of connective tissue. Physical properties of healing wounds in young and old rats. Am J Physiol; 224: 1167, 1973
57. Gabbiani, G. : Granulation tissue as a contractile organ: A study of structure and function, J Exp Med; 135:719, 1972
58. Schumm, Ph. : Principios de Bioquímica. Ed. El Manual Moderno, 4a, edición; México, 1989
59. Harper, H. : Manual de Química Fisiológica. Ed. El Manual Moderno, 7a. edición; México, 1990
60. Hershey, M. S. : Influxion of arginine, leucine and phenylalanine. Endocrinology; 91:205, 1972
61. Massimo, M. D. and Franco, M. : C-Peptide response to arginine stimulation in diabetic children. J Pediatrics; 96(3), Part I: 362-366, 1980
62. Zerbib, A., Ribes, G. and Gross, R. : Hipersensitivity to arginine of the β and D pancreatic cells in adults streptozotocin-diabetic rats. Acta Endocrinol; 12:345-349, 1989
63. Cunningham, R. and Werner, K. M. : Isolation, characterization and mapping of *Escherichia coli*. Mutation blocked in the synthesis; 2: 791-799, 1975
64. Bromme, H. J., Hahn, H. J., Lucke, S. and Hildebrandt, W. : Arginine stimulated insulin and glucagon release from islets transplanted into the liver of diabetic rats. Horm Metab Res; 21: 587-589, 1989
65. Taminaga, M., Komiya, I. and Johnson, H. J. : Loss of insulin response to glucose but not arginine during development of autoimmune diabetes in BB/rats: relationships to isolated volume and glucose transport rate. Proc Nat Acad SCI USA, 1990

66. Kishino, Y. and Kawamura, S. : Pancreatic damage induced by large dose of arginine. *Virchows Archiv (Cell Pathology)*; 47: 147-155, 1984
67. Spector, B. E., Rice, S. C. H., Moedjano, S., Bernard, F. and Kederbaum, D. : Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Bioc Med*; 28: 165-175, 1982
68. Lehninger, A. L. : *Biochemistry*. Worth; New York, 571, 1970
69. Konarska and Colombo : Arginase activity in human fibroblast culture. *Clin Chim Acta*; 115: 85-92, 1981
70. Farron, F. : Arginase isoenzymes and their detection by catalytic staining in starch gel. *Anal Biochem*; 53: 264-268, 1973
71. Jerogouich, I., Zuzic, I., Fiser Herman, M. and Straus, B. : A simple method for serum arginase determination. *Clin Chim Acta*; 30: 765-774, 1970
72. Van Elseni, A. and Leroy, G. : Arginase isoenzymes in human diploid fibroblast. *J Biol Chem*; 62 (2) : 191-198, 1975
73. Baranozy, K., Kuzma, A. and Skrypec Osceck, I. : Arginase form human blood serum. *Bicoche Med*; 27: 48-52, 1972
74. Ville Breit, F. and Orth, G. : Rabbit liver arginase. *J Biol Chem*; 247: 1227-1235, 1972
75. Hosoyama, Y. : The reversible inactivation of rat liver arginase for low pH. *Eur J Biochem*; 27:48-52, 1972
76. Negoya, M : Ultramicromethod for the determination of human arginase in the presence of urea. *Clin Chim Acta*; 71:413-418, 1976
77. Verma, A. and Boutwell, B.: Characterization of arginase activity form mouse epidermis and its relation of ornithine decarboxylase induction by the tumor promoting agente 12-o-tetradecanomyolphorbol-13-acetate. *Biochim Biophys Acta*; 677:184-189, 1981
78. Herzfeld, A. and Raper, S. : The heterogeneity of arginase in rat tissues. *Biochem J*; 153: 469-478, 1976

79. Yip, M., Morris, C. and Knox, W.: Function of arginase in lacting mammary gland. *Biochem J*; 127:893-899, 1972
80. Harri, M. and Haritala, K. : Arginase activity in rat small intestinal mucosa. *Acta Physiologia Scand*; 89:126-128, 1973
81. Oka, T. and Perry, J. : Arginase effects lactogenesis through its influence on the biosynthesis of spermidine. *Nature*; 250: 660-661, 1974
82. Pace, C. and Landers, R. : Arginase inhibition. *Biochem Biophys Acta*; 648 (2): 410-412, 1981
83. Beuter, J., Colombo, J. and Bachmann, C. : Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes. *Biochem J*; 175: 449-454, 1978
84. Aguirre, R. and Kashe, V. : Catalytically active monomer forms of immobilized arginase. *Eur J Biochem*; 67: 307-314, 1982
85. Remesar, X., Arola, Ll., Palou, A. and Alemany, M. : Arginase activity during pregnancy and lactation. *Horm Metab Res*; 16: 468-470, 1984
86. Jakway, J. and Morris, H. : Serum factors required for arginase induction in macrophages. *Cellular Immunol*; 54: 253-263, 1980
87. Reyer, C. and Dörner, F.: Purification of arginase from human leukemic lymphocytes and granulocytes of their physicochemical and kinetic properties. *Eur J Biochem*; 56:137-147, 1975
88. Smith, R.: Proline metabolism in cartilage: The importance of proline biosynthesis. *Metabolism*; 27(6), 1978
89. Hicks, J.J. y Díaz, J.C. : Bioquímica e Inmunología. Fac. de Medicina, U.N.A.M., 1a edición, México, 687-690, 1988
90. Morris, D. R. : A new perspective on ornithine decarboxylase regulation: Prevention of polyamine toxicity is the overriding theme. *J Cell Biochem*; 46:102-105, 1991
91. Baldwin, R. L. and Milligan, L. P. : Enzymatic changes associated with the initiation and maintenance of lactation in the rat. *J. Biol Chem*; 241:2958-2065, 1966

92. Carvajal, N., Venegas, A., Oestreicher, G. and Plaza, M. : Effect of manganese on the quaternary structure of human liver arginase. *Bioch Biophys Acta*; 250: 437-442, 1971
93. Currie, G., Gyure, L. and Cifuentes, L. Microenvironmental arginine depletion by macrophages *in vivo*. *Br J Cancer*; 39:613-620, 1969
94. Albina, J., Mills, C. and Barbul, A. : Arginine metabolism in wounds. Dept of Surgery, Rhode Island, 1980
95. Kung, J. T. and Suzanne, F. : Suppression of *in vitro* cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. *J Exp Med*; 146: 665-672, 1977
96. Leibovich, S. J. and Ross, R. : A macrophage dependent factor that stimulation the proliferation of fibroblast *in vitro*. *Am J Pathol*; 84: 501, 1976
97. Tsukamoto, Y. and Hensel, W. : Macrophage production of fibronectin a chemoattractant for fibroblast. *J Immunol*; 127 (2);1981
98. Tedesco, T. A. and Mellman, W. I. : Argino-succinate synthetase activity and citrulline metabolism in cells culture from a citrullinemic sujet. *Proc Nat Acad SCI USA*; 57: 829-834, 1967
99. Siebold, J. R., Vitto, J., Donwart, B. B. and Prockop, D. J. : Collagen synthesis and collagenase activity from patients with diabetes and digital sclerosis. *J Lab Clin Med*; 105: 664-667, 1985
100. Faucett, W. : *Tratado de Histología*. Ed. Interamericana McGraw-Hill, 1a edición; México, 139-142, 1989
101. Carmack, D. W. : *Histología de Ham*. Ed. Harla, 9a. edición; México, 192-194, 1988
102. Montgomery, R. : *Bioquímica Médica*. Ed. Salvat, 1a. edición; Barcelona, España, 74-76, 1980
103. Woessner, J. F. : The Determination of hidroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch Biochem Biophys*; 13: 440-447, 1961
104. Siebold, J. R. : Digital sclerosis in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Arthritis Rheum*; 25: 1357-1361, 1982

105. Levin, M. E. , Boisseau, V. C. and Aviol, L. V. : Effects of diabetes mellitus on bone mass in juvenile and adult onset diabetes. *N Engl J Med*; 294: 241-245, 1976
106. Yue, D. K., Marsh, M. M., May, Y. W., Spaliviero, J., Delbridg, L. and Turtle, J. R. : Effects of experimental diabetes, uremia and malnutrition on wound healing. *Diabetes*; 36: 295-299, 1987
107. Spanheimer, R. G., Umpierrez, G. E. and Stumpt, V. : Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes*; 37: 371-376, 1988
108. Willershausen Zönnchen, B. : Influence of high glucose concentrations on glycosaminoglycan and collagen synthesis in cultured human gingival fibroblast. *J. Clin Periodontol*; 18: 190-195, 1991
109. Méndez, J. D. and Arreola, M. A. : Effect of L-arginine on pancreatic arginase Activity and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Inter*; 28(4): 569-575, 1992
110. Bernal, A., Méndez, J. D. y Rosado, A. : Determinación rápida del peso seco por colorimetría. *Arch Invest Med (Mex)*; 12: 83, 1981
111. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193: 264-275, 1951
112. Geyer, J. W. and Dabich, D. : Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates anat. *Biochem*; 39:412, 1971
113. Chinard, F. P. : Photometric estimation of proline and ornithine. *J Biol Chem*; 48: 606, 1952
114. Giles, K. W. and Myers, A. : An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature*; 206:93, 1965
115. Burton, K. J. : A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem*; 62: 315, 1956
116. Márquez de Cantú, M. : Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, 1a. edición; México, 1988
117. Tsokos, M.: Estadística para Biología y Ciencias de la Salud. Ed. Interamericana/McGrawHill, 1a. edición; España, 305-315, 1987