



300627
19
20

UNIVERSIDAD LA SALLE
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

"ACTIVIDAD DE ARGINASA Y NIVELES DE POLIAMINAS
EN LA ETAPA INICIAL DEL PROCESO DE REPARACION
DE HERIDAS EN PIEL DE RATA HIPERGLUCEMICA."

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
PRESENTAN

CONSUELO MARTINEZ GIGENA
LISBETH ROSALINDA RINCON CABRERA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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

MEXICO, D.F.

1994



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 de tesis experimental se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Experimental de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, I.M.S.S.

Bajo la dirección del D. en C. José Domingo Méndez Francisco.

Agradecemos el apoyo brindado para la realización de este trabajo de tesis experimental a:

Q. Patricia Elizalde Galván y Q. Elba Rojas Escudero, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, U.N.A.M.

Dr. Alfonso Hernández Berumen del Departamento de Patología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, I.M.S.S.

Beckman Instruments de México.

Este trabajo está dedicado a Dios y a nuestros padres,

por quienes existimos y somos;

a nuestros hermanos por su compañía,

a nuestros seres queridos y amigos

y a todos aquéllos que creyeron en nosotras

brindándonos su apoyo.

Consuelo y Lisbeth

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION.	1
OBJETIVOS.	2
CAPITULO I. GENERALIDADES.	3
INFLAMACION Y REPARACION.	4
PIEL.	6
DIABETES MELLITUS.	8
POLIAMINAS.	11
L-ARGININA.	14
ARGINASA.	16
CAPITULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	17
CAPITULO III. RESULTADOS.	22
ANALISIS BIOQUIMICO.	23
ANALISIS HISTOLOGICO.	37
CAPITULO IV. ANALISIS DE RESULTADOS.	38
CAPITULO V. CONCLUSIONES.	41
REFERENCIAS.	43
APENDICE.	48

INTRODUCCION

La diabetes mellitus es una enfermedad sistémica que se caracteriza por una incapacidad para controlar la glucosa sanguínea; es causada por deficiencia absoluta o relativa de insulina y se asocia frecuentemente con lesiones específicas de la microcirculación, alteraciones neuropáticas y predisposición a la aterosclerosis. Entre los órganos que se ven afectados en esta enfermedad se encuentra la piel. Debido a las complicaciones en la macro y microcirculación características en pacientes diabéticos, el proceso de reparación de heridas se encuentra afectado.

Varios estudios han demostrado que la L-arginina desempeña un papel importante en el proceso de cicatrización de heridas al participar directamente en la formación de tejido conectivo a través de la síntesis de prolina e hidroxiprolina. Se ha demostrado que con la adición de un suplemento de L-arginina en la dieta de animales heridos se obtiene un incremento en los niveles de colágena.

La L-arginina también participa en el ciclo de la urea y en la síntesis de poliaminas al ser hidrolizada por medio de la arginasa, produciendo ornitina y urea. La ornitina es precursor de la síntesis de poliaminas, moléculas que intervienen en la regulación de diversos procesos tales como crecimiento, multiplicación y proliferación celular.

Este trabajo se diseñó para investigar el efecto de la L-arginina en la etapa inicial del proceso de reparación de heridas en piel de ratas hiperglucémicas.

OBJETIVOS:

- 1. Evaluar el efecto de la L-arginina en la etapa inicial del proceso de cicatrización.**
- 2. Determinar los cambios en la actividad de arginasa durante la etapa inicial del proceso de reparación de heridas en piel de rata hiperglucémica.**
- 3. Medir los niveles de pollaminas en heridas inducidas en piel de ratas tratadas con aloxana.**

CAPITULO I

GENERALIDADES

INFLAMACION Y REPARACION

En cuanto se produce una lesión en el tejido se desarrollan dos fenómenos diferentes. Uno, la inflamación, que es la acumulación extravascular de células y líquido (el exudado inflamatorio); y el otro, la restitución o reparación de los tejidos.

La inflamación aguda es la reacción local inicial a la lesión y una de sus características es la afluencia de células neutrófilas al área lesionada. Después de producida la lesión los vasos del área reducen su diámetro y posteriormente se dilatan, este cambio vascular aumenta el flujo hacia el área. Los eritrocitos y leucocitos se dirigen desde el centro del vaso hacia sus bordes. Debido a la vasodilatación se crean espacios libres entre las células endoteliales. Hay mayor salida de sales, agua y proteínas. Los polimorfonucleares (células inflamatorias) abandonan el torrente sanguíneo entre las células del vaso intacto por un proceso denominado diapedesis.

El paso siguiente es la migración de células. Los primeros leucocitos que tienen atracción hacia el área, por un factor químico liberado por las células lesionadas (quimiotaxis), son los polimorfonucleares o neutrófilos. A continuación emigran los monocitos y posteriormente los linfocitos.

Los neutrófilos son células que tienen un núcleo con varios lóbulos y pueden asumir distintas formas; se les llama células polimorfonucleares. Son elementos celulares fagocíticos que pueden ingerir microorganismos, otras células y cuerpos extraños. En su citoplasma existen numerosos gránulos que contienen enzimas que pueden digerir tejido celular incluyendo bacterias.

Los macrófagos aparecen después de los neutrófilos y también se conocen como histiocitos y derivan de los leucocitos monocitos. Estas células fagocitan material extraño, células muertas y restos en la zona de la inflamación. En algunos casos, el citoplasma de varios macrófagos se fusiona para formar una célula grande con varios núcleos, denominada célula gigante.

Los linfocitos aparecen en fases posteriores del proceso inflamatorio. Existen varios tipos de linfocitos cuya principal función es reconocer al material extraño (antígeno) y elaborar una respuesta inmune.

Los signos clásicos de la inflamación se explican por la salida de líquido y células de los vasos en el área lesionada. El rubor y calor son producidos por el mayor flujo hacia la zona; el edema (tumor), por el exudado que llena los espacios intersticiales; y el dolor por la presión del edema contra las terminaciones nerviosas y por la liberación de prostaglandinas que sensibilizan los nervios locales. El quinto síntoma clásico es pérdida de la función, que depende de la localización y el grado de lesión.

Las células que son movilizadas específicamente en los primeros periodos de la reparación de la herida son los fibroblastos. Estos son células jóvenes de tejido conectivo que producen fibras de colágena. En conjunto, la respuesta fibroblástica y la neoformación capilar se denomina tejido de granulación.

Cuando el factor nocivo es superado, la inflamación cede y el tejido se restituye. Todos los mecanismos estimulados por la lesión de los tejidos y que eventualmente contribuyen a tender un puente sobre la herida y restablecer la continuidad anatómica y fisiológica, se agrupan en la denominación general de restitución de los tejidos. Estos mecanismos corresponden a tres tipos generales, que son los siguientes:

a) Reparación.

Comprende una serie de fenómenos aparentemente heterogéneos que tienen lugar en los tejidos conectivos, que comienzan con la producción de la lesión y continúan hasta que el defecto anatómico ha sido llenado por completo.

b) Retracción.

Se observa en heridas de la piel con pérdida de sustancia, y se caracteriza por la aproximación progresiva de los bordes de la herida y una reducción considerable del tamaño de la solución de continuidad, que debe ser llenada por el proceso de reparación con una cicatriz.

c) Regeneración.

Se refiere a la restitución de elementos epiteliales, es decir a la reparación de la lesión de los tejidos por las células específicas restantes o sus precursores.^{1,2}

PIEL

ANATOMIA Y FISIOLOGIA DE LA PIEL

El papel de la piel es de primer plano en la capacidad del hombre para mantener la homeostasis. Está compuesta de elementos epiteliales, mesenquimáticos, glandulares y neurovasculares. Este sistema intertegumentario, que tiene probablemente la permeabilidad al agua más baja que cualquier membrana biológicamente producida, impide que el hombre se deshidrate y retarda la entrada de agentes potencialmente tóxicos desde el medio ambiente. La homeostasis térmica depende también de la piel. La piel puede impedir daños en los tejidos subyacentes por muchos factores externos físicos de estrés, como la radiación ultravioleta y las fuerzas mecánicas, y puede impedir la invasión de la mayoría de los microorganismos.^{3,4}

La piel se puede considerar en su conjunto como un órgano del tacto; actúa también como órgano protector de factores mecánicos, térmicos y químicos, que proceden del exterior e interviene en el intercambio de gases, regulación de la temperatura y eliminación de secreciones. Las funciones de la piel se encuentran relacionadas con otros aparatos y sistemas.^{5,6,7}

HISTOLOGIA DE LA PIEL

Generalmente se considera a la piel en términos de sus dos capas principales: epidermis y dermis, no sólo con respecto a su desarrollo y morfología funcional, sino también en términos de desórdenes y procesos patológicos. Ambas capas tienen íntima relación funcional y son mutuamente interdependientes.^{3,5,7}

La epidermis está compuesta de células de diferentes tipos, funciones y origen. Es un epitelio poliestratificado formado por varias capas. Estas capas de la profundidad a la superficie son:

- Estrato basal o germinativo
- Estrato espinoso o de Malpighi

- Estrato granuloso
- Estrato córneo

Entre la epidermis y la dermis existe una membrana de espesor variable que se encuentra bajo la capa basal. Esta membrana da cohesión a la unión de la epidermis con la dermis.

La dermis es un denso estroma fibroelástico de tejido conectivo que encierra densas redes vasculares y nerviosas así como glándulas y apéndices especializados que derivan de la epidermis. Una de sus funciones es la reparación de heridas en los procesos de remodelación del organismo durante el desarrollo y envejecimiento del mismo.³ La dermis está formada por tres clases de fibras: colágena, reticulina y elastina; una sustancia fundamental y células (fibroblastos, mastocitos, macrófagos y linfocitos, entre otras).^{5,7}

Químicamente, la piel se encuentra constituida por agua, electrolitos, minerales, proteínas, lípidos, carbohidratos, enzimas y vitaminas.⁵

DIABETES MELLITUS

DEFINICION

La diabetes mellitus es una alteración determinada genéticamente del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, asociada con una insuficiencia absoluta o relativa de la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a la misma.^{8,9} En su expresión clínica totalmente desarrollada se caracteriza por hiperglicemia en el ayuno y en la mayoría de los pacientes a largo plazo por complicaciones vasculares microangiopáticas, especialmente en el ojo y en el riñón, por una frecuencia aumentada en enfermedades macrovasculares, tales como enfermedad coronaria y vascular periférica, y por neuropatía.¹⁰⁻¹⁶ Aunque las principales diferencias fenotípicas en diabetes clínica han sido apreciables desde hace un siglo, es hasta hace unos doce años que se incrementa el conocimiento de la etiología y patogénesis de la diabetes, definiéndola como un grupo heterogéneo de alteraciones. La heterogeneidad implica que hay diferencias en varios grupos de pacientes en términos de factores genéticos, medioambientales e inmunes, en la historia natural y en la respuesta del tratamiento. Por ésto se considera que la diabetes no es una simple enfermedad sino un síndrome.⁹

En 1979 un grupo de trabajo patrocinado por el Grupo Nacional de Datos de Diabetes (NDDG) de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos, publicó una clasificación de la diabetes mellitus y otras categorías de intolerancia a la glucosa. Esta fue adoptada y modificada ligeramente por la OMS.¹⁷

CLASIFICACION

La clasificación incluye tres clases clínicas y dos clases de riesgo estadístico. Las clases consideradas como clínicas son las siguientes:

1. La diabetes mellitus caracterizada, ya sea por hiperglicemia en el ayuno, o por niveles de glucosa plasmática por arriba de los límites definidos durante una prueba de tolerancia a la glucosa.^{8,9}

Esta clase se subdivide en cuatro tipos que parecen definir la categoría y patogénesis, éstos son:

- a) Tipo I. Dependiente de insulina (IDDM).
- b) Tipo II. No-dependiente de insulina (NIDDM).
- c) Diabetes mellitus relacionada con mala nutrición (MRDM)
- d) Otros tipos. Incluyen diabetes mellitus asociada con ciertas condiciones y síndromes.

La diabetes tipo I y II son las principales formas clínicas en el mundo occidental, mientras que la diabetes relacionada con mala nutrición es la principal forma clínica en Asia, África y el Caribe. En la cuarta categoría, otros tipos, se clasifican varias entidades que anteriormente fueron definidas como secundarias o diabetes asociada con ciertos síndromes genéticos raros.¹⁸⁻²²

2. Desajustes en la tolerancia a la glucosa (IGT), que se caracterizan por niveles de glucosa plasmática que cursan por arriba de lo normal pero abajo de aquellos definidos como diabetes durante una prueba de tolerancia a la glucosa.^{8,9,23}

3. Diabetes gestacional (GDM). Los pacientes con GDM muestran intolerancia a la glucosa durante el embarazo. Una persona diabética que se llega a embarazar no entra en esta clasificación. La diabetes gestacional se presenta en aproximadamente el 2% de todos los embarazos y está asociada con incrementada morbilidad y mortalidad perinatal y elevada frecuencia de pérdida de fetos viables.^{8,9,17,24}

Existen, además, dos clases denominadas de riesgo estadístico en donde se incluyen a los individuos que en el pasado han tenido una alteración en la tolerancia a la glucosa o a los individuos que tienen una relación genética estrecha con un diabético. Estos sujetos tienen alto riesgo de desarrollar diabetes en el futuro. Las clases de riesgo estadístico son: anomalía previa de tolerancia a la glucosa y anomalía potencial de tolerancia a la glucosa.^{8,9,17}

DIABETES INDUCIDA

En algunos animales la diabetes se presenta espontáneamente o puede ser inducida por sustancias químicas, procedimientos quirúrgicos o por infecciones virales entre otras causas.

La inducción de diabetes se ha logrado en diversas especies de mamíferos empleando diferentes técnicas experimentales como la pancreatoclectomía y la inducción química en la que se emplea principalmente aloxana y estreptozotocina. El uso de estos agentes diabetogénicos, que actúan específicamente sobre las células beta, permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos, hormonales y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético.^{25,26,27}

POLIAMINAS

Las poliaminas son sustancias alifáticas, no proteínicas, de bajo peso molecular. De éstas la putrescina, la espermidina y la espermina constituyen el grupo de poliaminas que ha sido más estudiado.

Las poliaminas cumplen una función importante en la regulación de diversos procesos tales como crecimiento y proliferación celular, multiplicación y diferenciación. Estas moléculas, a semejanza de los ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas se encuentran distribuidas ampliamente en los sistemas vivientes, lo que quizás sea un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de la función celular. Las poliaminas también están presentes en tejidos de mamíferos y en fluidos corporales asociadas covalentemente con proteínas, por ejemplo, formando enlaces bis-(alfa-glutamil)espermidina.^{28,29}

En los mamíferos, incluyendo al hombre, la espermidina y la espermina están presentes en la mayor parte de los tejidos, en una concentración aproximada de 1mM, mientras que la putrescina está generalmente presente en concentraciones bajas, excepto en tejidos que están estimulados al crecimiento o que tienen un comportamiento celular proliferativo, como es el caso de la médula.³⁰

Los niveles intracelulares de poliaminas, particularmente espermina y putrescina aumentan espectacularmente con el crecimiento, tanto en células normales como neoplásicas.

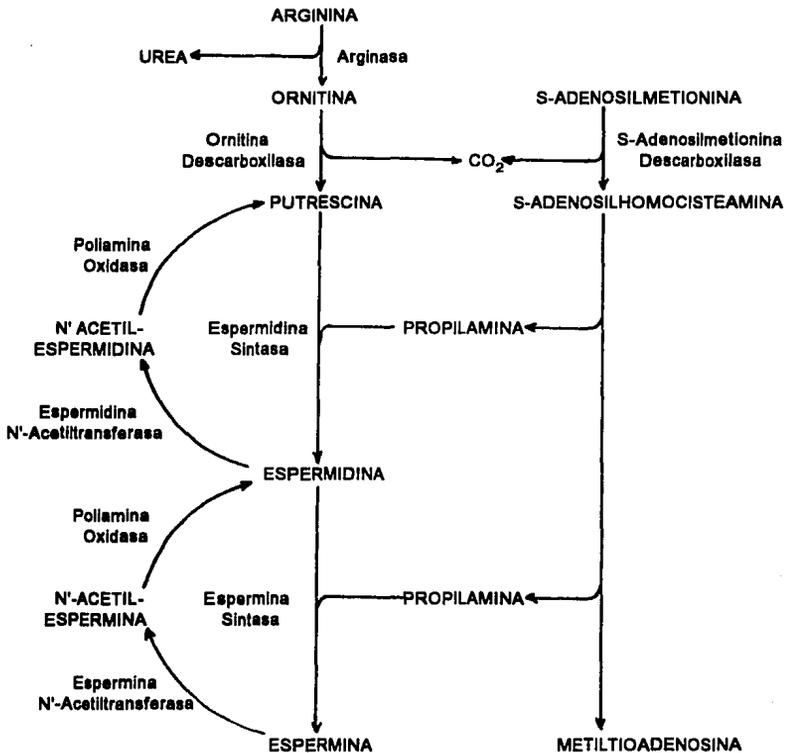
La putrescina es el precursor de la síntesis de la espermidina y la espermina; en las células animales esta diamina se obtiene de la ornitina, sin embargo en las células vegetales superiores, en bacterias y hongos la putrescina se puede obtener a partir de agmatina, que a su vez es producida por la descarboxilación de la arginina.²⁸

SINTESIS DE POLIAMINAS

La mayoría de las enzimas que participan en la biosíntesis de poliaminas, se localizan en el citosol. En los mamíferos la ornitina descarboxilasa (ODC) cataliza el paso inicial en la biosíntesis de poliaminas. Esta enzima transforma la ornitina en putrescina. La espermidina y la espermina se

forman a través de la putrescina y espermidina respectivamente por la transferencia de un residuo de propilamina aportado por la S-adenosilhomocisteamina, el producto descarboxilado de la S-adenosilmetionina. Estas reacciones están catalizadas por las enzimas S-adenosilmetionina descarboxilasa, espermina y espermidina sintasas.^{31,32}

La ornitina necesaria para la síntesis de poliaminas proviene del plasma, además de que puede formarse por acción de la arginasa a partir de L-arginina, como lo demuestra el hecho de que durante el aumento en la síntesis de poliaminas aumenta la actividad de arginasa.²⁸



Hay una fuerte evidencia de que las poliaminas son esenciales para el crecimiento y proliferación celular. Los estímulos asociados con estos eventos provocan cambios en los niveles celulares de poliaminas, en particular se incrementa el contenido de espermidina.³³

METABOLISMO DE POLIAMINAS EN PIEL

Las poliaminas han sido detectadas y medidas en dermis y epidermis humana. Se ha encontrado que los niveles de poliaminas entre estas dos porciones de piel, varía notablemente tanto cuantitativa como cualitativamente. Se han detectado niveles más altos de espermidina y espermina en la epidermis que en la dermis.

Estos valores reflejan las diferencias en la actividad proliferativa y diferenciación entre las dos regiones. Las concentraciones tan elevadas de espermidina y espermina en la epidermis se deben probablemente a que éstas cumplen una función importante en este tejido.³⁴

Bethell, et. al., estudiaron la actividad de las enzimas que participan en la biosíntesis de poliaminas y midieron la concentración intracelular de putrescina, espermidina y espermina en fibroblastos de ratón. Sus resultados sugieren que los niveles de poliaminas están controlados por un complejo en el que participan estas enzimas.³³

L-ARGININA

La L-arginina o ácido alfa amino-delta guanidin-valeriánico, es un aminoácido alifático que ha sido considerado como semiesencial para los mamíferos y las aves, ya que aún cuando lo sintetizan, también lo requieren en la dieta para mantener niveles adecuados en el organismo, sobre todo en las etapas tempranas del desarrollo para sostener una síntesis activa de proteínas y para la realización de múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos.³⁵ Este aminoácido sigue varios destinos metabólicos por lo que sus niveles plasmáticos pueden detectarse bajos en un momento dado. Algunos órganos y tejidos pueden requerir de un mayor aporte de L-arginina por las funciones que desempeñan, tal es el caso del hígado y del páncreas.



METABOLISMO DE L-ARGININA

El metabolismo de L-arginina ocurre por dos mecanismos que son complementarios.

1) Hidrólisis enzimática, que ocurre por acción de la enzima arginasa no sólo en el ciclo de la urea sino también en tejidos extrahepáticos y que lleva a la formación de ornitina y urea.

2) Desaminación oxidativa, proceso por el cual se conserva el radical guanidínico y se hace posible su utilización en la síntesis de creatina y de otros productos con gran actividad biológica.

La importancia de la L-arginina se debe a que participa en varios procesos metabólicos.

En primer lugar este aminoácido participa en el ciclo de la urea, donde se elimina el amoníaco formado por la desaminación oxidativa de los aminoácidos, el cual es desechado en la orina en forma de urea. También participa directamente en la formación de tejido conjuntivo al formarse a partir de ella la prolina e hidroxiprolina, aminoácido importante para la síntesis de colágena.

La L-arginina también es un aminoácido glucogénico ya que se oxida a glutamato y éste por oxidación produce alfa cetoglutarato, un intermediario de la síntesis de glucosa.³⁵

La L-arginina, junto con la L-glicina y L-metionina, participa en la síntesis de creatina, la cual es un compuesto clave para el almacenamiento de grupos fosfato en forma de fosfocreatina en músculos y nervios.

Este aminoácido, también forma parte de las histonas y protaminas junto con la lisina, siendo las histonas H3 y H4 las que presentan la mayor cantidad de L-arginina. La función de este aminoácido en las histonas es la de dar una carga positiva a esta proteína a un pH neutro para que se pueda combinar con el DNA diplohelicoidal cargado negativamente, dando lugar a complejos DNA-Histona, los cuales son una manera de compactar la cadena de DNA en células eucariotes.

La L-arginina interviene en la producción de poliaminas, ya que por medio del ciclo de la urea, este aminoácido es hidrolizado por la enzima arginasa, formando urea y ornitina, este último aminoácido interviene en la producción de poliaminas.^{36,37}

ARGINASA

La arginasa, enzima que cataliza la hidrólisis de L-arginina a ornitina y urea, fue detectada inicialmente en el hígado de mamíferos; en la actualidad diversos estudios han demostrado su presencia, aunque en cantidades menores, en otros tejidos como riñón, testículos y bazo.

En los animales, la arginasa existe en la fracción soluble del citoplasma y, además, en las diversas estructuras celulares como mitocondrias, lisosomas y aparato de Golgi.³⁵

La arginasa posee un peso molecular aproximado de 130,000 daltones. Es un tetrámero constituido por cuatro subunidades o monómeros, cada uno de los cuales tiene un peso molecular de 30,000-40,000 daltones y posee un ion Mn^{+2} íntimamente unido. Esta enzima requiere la presencia de un catión divalente, como Mn^{+2} , para su actividad.³⁸ Para la arginasa se han identificado diversas formas moleculares, isoenzimas, las cuales presentan diferencias en algunas propiedades básicas como movilidad electroforética, solubilización y sensibilidad al calor.

Además de la función hepática, donde participa en el ciclo de la urea, la actividad de arginasa está asociada con la regulación de diversos procesos celulares, como la biosíntesis de poliaminas donde facilita la disponibilidad de ornitina.

La actividad de la arginasa está presente en el tejido epidérmico normal, y se encuentra elevada en muchas enfermedades asociadas con hiperplasia e hiperqueratinización epidérmica. La arginasa hidroliza la arginina a ornitina y la urea formada es excretada.

Se piensa que la arginasa de la epidermis sirve para proveer ornitina, la cual se ha asociado con la proliferación celular mediante la ruta de poliaminas. La actividad de la arginasa se ha determinado en el músculo de animales con y sin herida, encontrándose una marcada elevación de la actividad de ésta, en el tejido herido. En la epidermis, la arginasa regula el aporte de L-arginina o sus productos metabólicos en el metabolismo celular, esta enzima también regula el metabolismo de la prolina, la cual es necesaria en la biosíntesis de proteínas epidérmicas.

Verma y Boutwell al estudiar la actividad de arginasa en epidermis de ratón, proponen que la elevada actividad de esta enzima en dicho tejido puede desempeñar una función importante en la biosíntesis de poliaminas, en la producción de glutamato y prolina así como también en la producción de proteínas queratinosas.^{38,39}

CAPITULO II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon ratas macho de la cepa Long evans con un peso aproximado de 284 ± 13 g., mantenidas en un bioterio en condiciones adecuadas de alimentación y temperatura.

MATERIAL QUÍMICO Y APARATOS ANALÍTICOS

Se emplearon todos los reactivos necesarios para la determinación de peso seco, proteínas totales, actividad de arginasa y concentración de poliaminas en piel, y niveles de glucosa en suero.

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

Para la lectura de las otras cuantificaciones se utilizó un Espectrofotómetro Beckman DU-64.

METODOLOGÍA

Los animales de experimentación se dividieron en once grupos de 5 ratas a las cuales se les indujo diabetes. La diabetes fue inducida administrando una solución de aloxana (250 mg/ml de solución salina estéril al 0.9%) por vía intravenosa, en una dosis de 120 mg/kg de peso. Esto produce un estado de diabetes inducida por daño específico a las células beta del páncreas. Después de 96 hrs. de aplicada la aloxana se encuentran los niveles más altos de glucosa en suero; por este motivo se comenzó a trabajar con las ratas a partir de este momento.

GRUPO CONTROL.

A este grupo sólo se le realizaron las determinaciones bioquímicas en sangre y piel intacta.

GRUPO I.

A este grupo de ratas se le provocó una herida de 4 cm. en la región abdominal siguiendo la línea media afectándose la epidermis y la dermis. Se les administró 1 ml de solución salina al 0.9%, i. p., y se sacrificaron a los 20 minutos.

GRUPO II.

A este grupo se le provocó una herida como en el grupo anterior. Se les administró 1 ml de solución de L-arginina 10 mM, i. p., y se sacrificaron a los 20 minutos.

GRUPO III.

Este grupo se trató como el número II y las ratas se sacrificaron una hora después de administrada la solución salina.

GRUPO IV.

Este grupo se trató como el número III y las ratas se sacrificaron una hora después de administrada la solución de L-arginina.

GRUPO V.

A este grupo se le provocó la herida, de la manera antes mencionada. Se suturaron y se les administró 1 ml de solución salina, i. p., inmediatamente después de la cirugía. Las ratas se sacrificaron 24 hrs. después.

GRUPO VI.

A este grupo de ratas se les provocó la herida, se suturaron y se les administró 1 ml de solución de L-arginina 10 mM, i. p., inmediatamente después de la cirugía. Las ratas se sacrificaron 24 hrs. después.

GRUPO VII.

Este grupo se trató como el número VI. A las 24 horas se les administró nuevamente 1 ml de solución salina, i. p. Las ratas se sacrificaron 48 horas después de la cirugía.

GRUPO VIII.

Este grupo se trató como el número VII. A las 24 horas se les administró nuevamente 1 ml de solución de L-arginina, i. p. Las ratas se sacrificaron 48 horas después de la cirugía.

GRUPO IX.

Este grupo se trató como el número VIII. A las 48 horas después de la cirugía, se les administró por tercera vez 1 ml de solución salina, i. p. Las ratas se sacrificaron 72 horas después de la cirugía.

GRUPO X.

Este grupo se trató como el número IX. A las 48 horas después de la cirugía, se les administró por tercera vez 1 ml de solución de L-arginina, i. p. Las ratas se sacrificaron 72 horas después de la cirugía.

Para facilitar la manipulación de las ratas, se anestesiaron utilizando dehidrobenzperidol (0.4 ml) y ketamina (0.6 ml).

Posteriormente se realizaron cortes en la región abdominal cercana a la herida producida, con el objeto de obtener muestras de tejido de la epidermis y la dermis.

Se extrajo una muestra de piel de 300 mg, la cual fue homogeneizada con un volumen de 5 ml de solución salina 0.9%. De este homogeneizado se tomaron las alícuotas necesarias para la determinación de:

- Peso seco. Método de Bernal, et. al.⁴⁰
- Proteínas totales. Método de Lowry.⁴¹
- Arginasa. Método de Kung, et. al.⁴²

Se homogeneizó una muestra de un gramo en un volumen de 5 ml de solución salina para la cuantificación de poliaminas. Esta determinación se realizó utilizando el Dabs-Amino Acid Kit de Beckman Instruments.

De cada grupo se extrajo a una rata una muestra de piel cercana a la lesión producida, la cual fue tratada con el método de eosina-hematoxilina y montada en preparación fija para su posterior análisis histológico al microscopio.

Se extrajo la sangre vía bifurcación de la aorta. La sangre se recolectó en tubos de ensaye, dejándose reposar 20 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. El suero obtenido fue enviado al Laboratorio de Análisis Clínicos del Centro Médico Nacional Siglo XXI, I.M.S.S., para la determinación de niveles de glucosa.

CAPITULO III

RESULTADOS

ANALISIS BIOQUIMICO

Se determinaron los niveles de glucosa en suero en cada uno de los animales tratados para comprobar que se encontraban en estado hiperglucémico (valores mayores a 250 mg/dl).

Las ratas mostraron una disminución de peso, de aproximadamente 20 g, desde el día en que fueron tratadas con aloxana hasta el día en que fueron sacrificadas, lo cual es un parámetro del estado hiperglucémico en que se encontraban.

Con el fin de verificar el grado de hiperglucemia en que se encontraban las ratas tratadas con aloxana, así como el daño producido a nivel de piel en la diabetes experimental, se trabajó en un principio con muestras de piel de ratas normales y ratas diabetizadas. A estas muestras se les cuantificó peso seco, proteínas totales y actividad de arginasa de acuerdo con las metodologías establecidas para este trabajo, encontrándose que no existía variación significativa entre las ratas normales y las hiperglucémicas. Estos resultados indican que el daño producido por la diabetes experimental aún no es tan severo como para presentarse las complicaciones crónicas características de la diabetes avanzada.

Por todo lo anterior, las ratas empleadas en este trabajo se consideran ratas hiperglucémicas en un estado inicial de diabetes.

Se determinó el peso seco a cada muestra para comprobar que la cantidad de materia orgánica presente fue la misma en cada una. Esta prueba cuantifica la cantidad de materia orgánica presente en una muestra biológica, eliminando la contribución del agua. (Datos no incluidos).

Se determinó la cantidad de proteínas totales presentes en piel, para expresar las unidades de la actividad de arginasa. Las tablas I y II muestran los resultados obtenidos con las ratas tratadas, a diferentes tiempos, con solución salina 0.9% y L-arginina 10 mM respectivamente.

En la tabla III, se incluyen los valores obtenidos en la determinación de la actividad de arginasa en las ratas que fueron tratadas con solución salina al 0.9%. La tabla IV, muestra los valores de la actividad de esta enzima, en las ratas que recibieron tratamiento con L-arginina 10mM. También se incluyen las gráficas correspondientes.

TABLA I. Concentración de proteínas totales en piel de rata tratada con solución salina al 0.9%.

GRUPO (tiempo de tratamiento) n=5	CONCENTRACION DE PROTEINAS ($\mu\text{g prot./mg tejido}$)*
CONTROL**	107.370 \pm 4.788
20 MINUTOS	106.783 \pm 0.317
1 HORA	123.786 \pm 8.531
24 HORAS	114.960 \pm 10.009
48 HORAS	153.610 \pm 5.626
72 HORAS	171.428 \pm 8.259

* Los datos representan el promedio \pm la desviación estándar.

** Este grupo incluye las ratas que no presentaron herida, no recibieron tratamiento alguno y representa el tiempo cero.

TABLA II. Concentración de proteínas totales en piel de rata tratada con L-arginina 10mM.

GRUPO (tiempo de tratamiento) n=5	CONCENTRACION DE PROTEINAS ($\mu\text{g prot./mg tejido}$)*
CONTROL**	107.37 \pm 4.788
20 MINUTOS	77.16 \pm 2.267
1 HORA	89.172 \pm 14.496
24 HORAS	164.042 \pm 6.201
48 HORAS	105.804 \pm 14.290
72 HORAS	91.963 \pm 6.207

* Los datos representan el promedio \pm la desviación estándar.

** Este grupo incluye las ratas que no presentaron herida, no recibieron tratamiento alguno y representa el tiempo cero

TABLA III. Actividad de arginasa en piel de rata tratada con solución salina al 0.9%.

GRUPO (tiempo de tratamiento) n=5	ACTIVIDAD DE ARGINASA (nmol urea/mg prot./ min.)*
CONTROL**	2.769 ± 0.338
20 MINUTOS	6.286 ± 0.233
1 HORA	4.117 ± 0.194
24 HORAS	3.535 ± 0.272
48 HORAS	5.375 ± 0.375
72 HORAS	3.287 ± 0.277

* Los datos representan el promedio ± la desviación estándar.

** Este grupo incluye las ratas que no presentaron herida, no recibieron tratamiento alguno y representa el tiempo cero.

TABLA IV. Actividad de arginasa en piel de rata tratada con L-arginina 10mM.

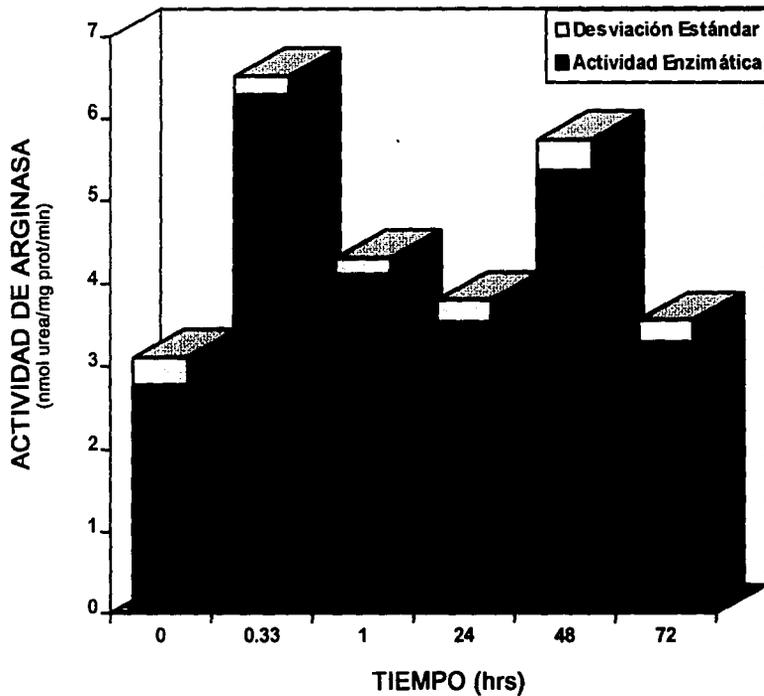
GRUPO (tiempo de tratamiento) n=5	ACTIVIDAD DE ARGINASA (nmol urea/mg prot./min.)*
CONTROL**	2.769 ± 0.338
20 MINUTOS	10.816 ± 0.637
1 HORA	3.988 ± 0.372
24 HORAS	6.040 ± 0.258
48 HORAS	6.387 ± 0.281
72 HORAS	4.570 ± 0.518

* Los datos representan el promedio ± la desviación estándar.

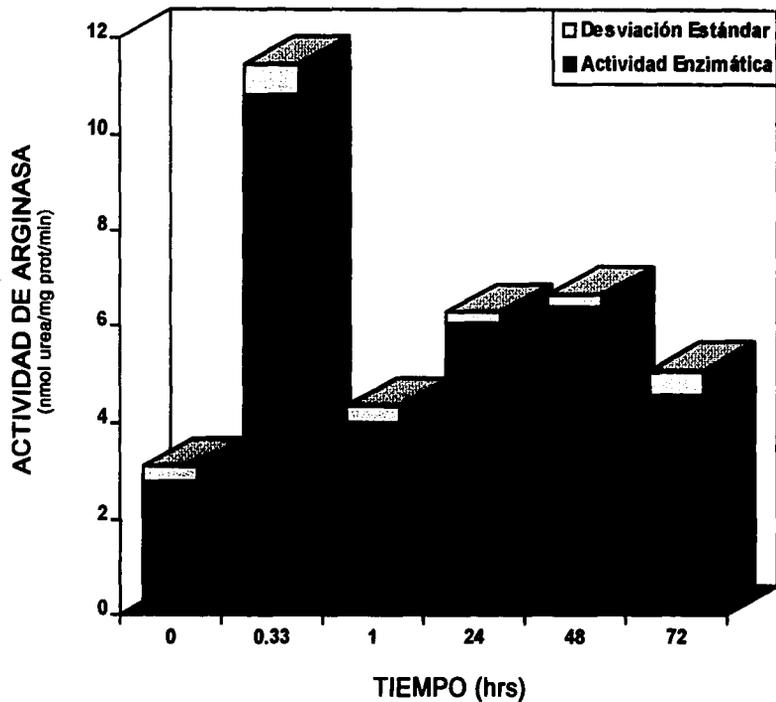
** Este grupo incluye las ratas que no presentaron herida, no recibieron tratamiento alguno y representa el tiempo cero.

ACTIVIDAD DE ARGINASA EN PIEL

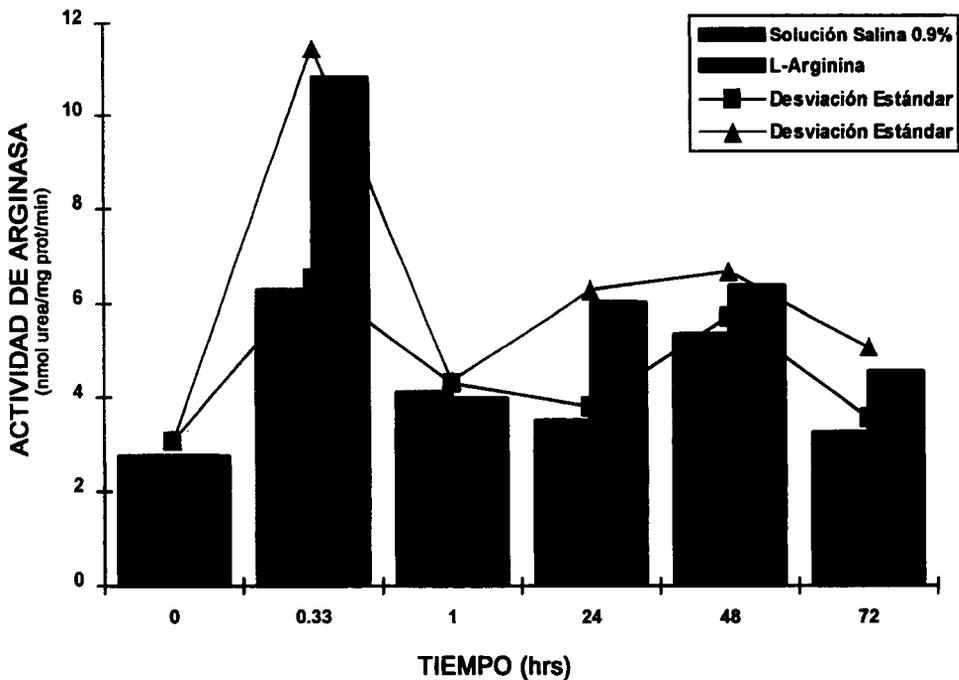
RATAS TRATADAS CON SOLUCION SALINA 0.9%



ACTIVIDAD DE ARGINASA EN PIEL RATAS TRATADAS CON L-ARGININA 10mM



ACTIVIDAD DE ARGINASA EN PIEL DE RATA



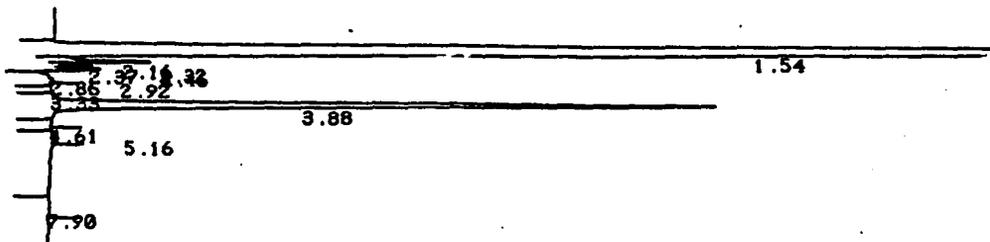
Los cromatogramas obtenidos en el análisis de poliaminas por HPLC, revelan la presencia de estas moléculas durante la etapa inicial del proceso de reparación de heridas en piel.

Los valores de poliaminas revelan que la distribución de estos compuestos varía considerablemente durante la etapa inicial del proceso de reparación de heridas en piel. Se observa que existe una mayor cantidad de putrescina en las muestras trabajadas. Así mismo, en la mayoría de las muestras estudiadas no se encontró el pico correspondiente a espermina y en aquellas en las cuales se alcanzó a detectar su presencia, los valores son muy bajos. La poliamina presente en mayor cantidad fue la putrescina, seguida por la espermidina, mientras que la espermina permaneció en menor proporción.

A continuación se presentan los cromatogramas de cada grupo trabajado.

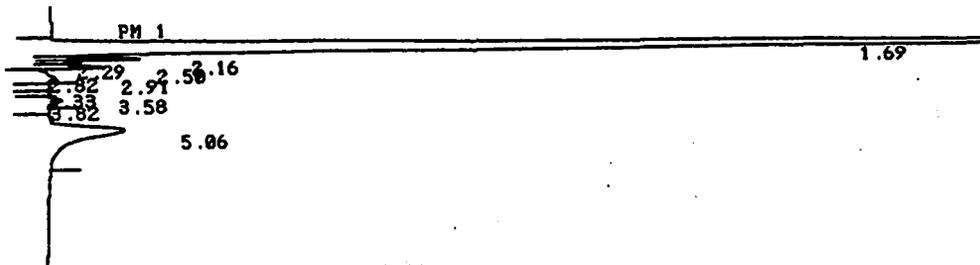
CROMATOGRAMAS CORRESPONDIENTES A LOS ESTANDARES DE PUTRESCINA ESPERMIDINA Y ESPERMINA (500 µM)

ESTANDAR DE PUTRESCINA



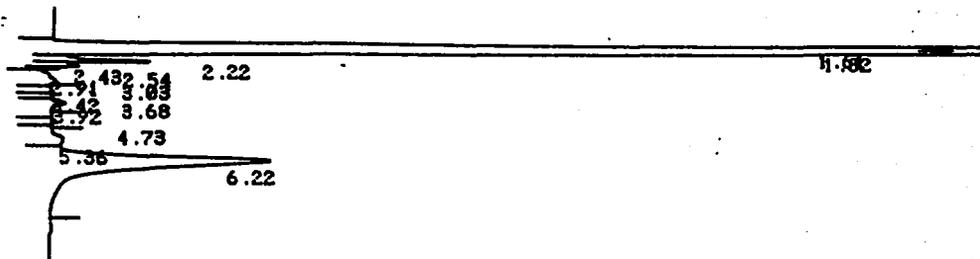
TIEMPO DE RETENCION	3.88
AREA BAJO LA CURVA	8104132

ESTANDAR DE ESPERMIDINA



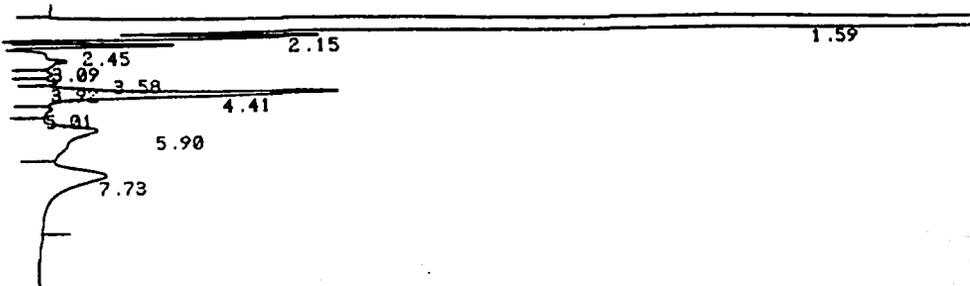
TIEMPO DE RETENCION	5.06
AREA BAJO LA CURVA	2826638

ESTANDAR DE ESPERMINA



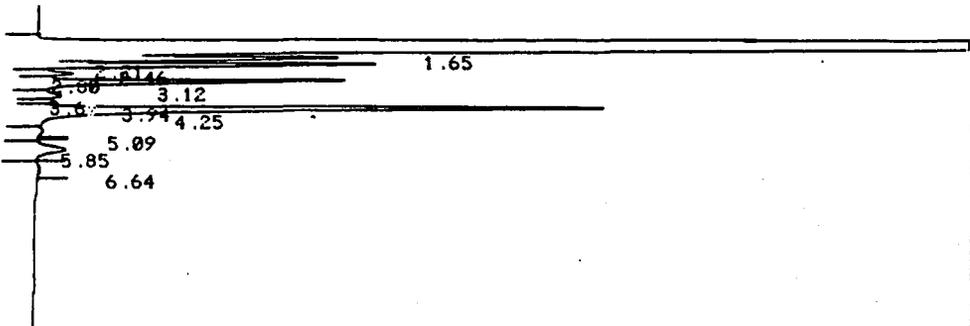
TIEMPO DE RETENCION	6.22
AREA BAJO LA CURVA	8164772

MEZCLA DE ESTANDARES



POLIAMINA	TIEMPO DE RETENCION
PUTRESCINA	4.41
ESPERMIDINA	5.90
ESPERMINA	7.73

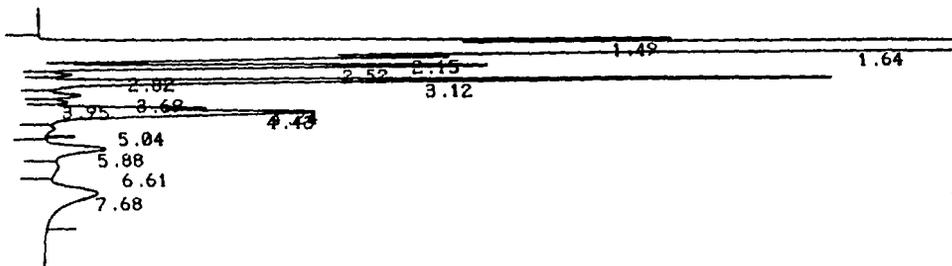
CROMATOGRAMA DEL GRUPO CONTROL



POLIAMINA	TIEMPO DE RETENCION	AREA BAJO LA CURVA
PUTRESCINA	4.25	3331453
ESPERMIDINA	5.85	255572
ESPERMINA	-	-

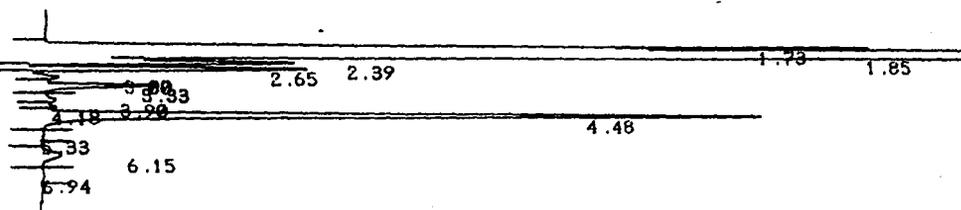
**CROMATOGRAMAS CORRESPONDIENTES A LOS GRUPOS
TRATADOS CON SOLUCION SALINA 0.9%**

GRUPO I. Tiempo de tratamiento: 20 minutos.



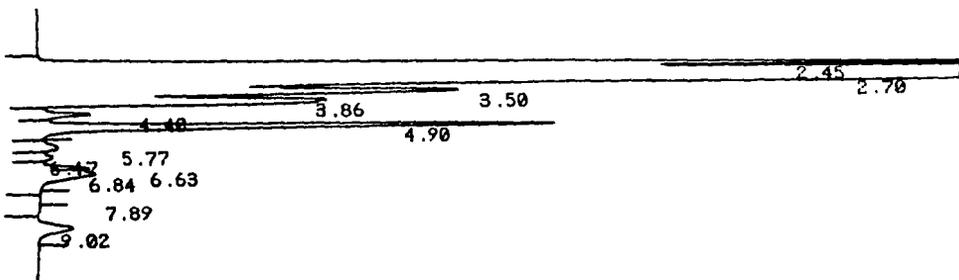
POLIAMINA	TIEMPO DE RETENCION	AREA BAJO LA CURVA
PUTRESCINA	4.43	2052924
ESPERMIDINA	5.88	683807
ESPERMINA	7.68	1290557

GRUPO II. Tiempo de tratamiento: 1 hora.



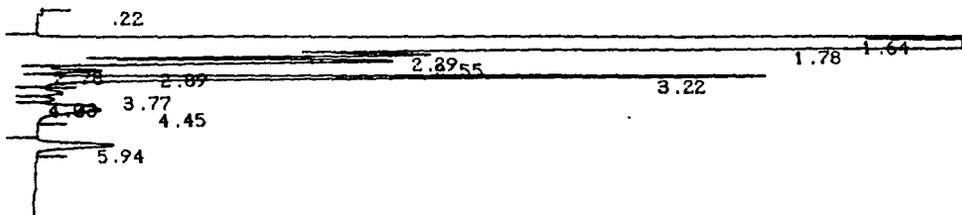
POLIAMINA	TIEMPO DE RETENCION	AREA BAJO LA CURVA
PUTRESCINA	4.48	4028038
ESPERMIDINA	6.15	193182
ESPERMINA	-	-

GRUPO III. Tiempo de tratamiento: 24 horas.



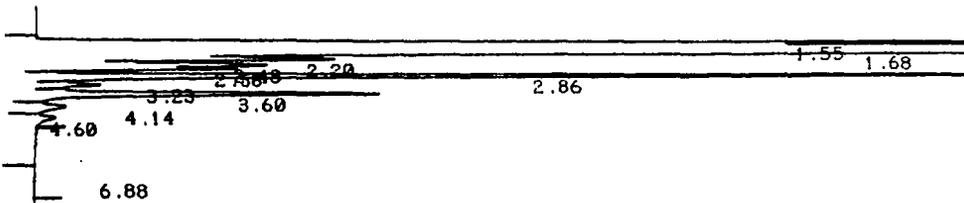
POLIAMINA	TIEMPO DE RETENCION	AREA BAJO LA CURVA
PUTRESCINA	4.40	317562
ESPERMIDINA	5.77	119589
ESPERMINA	7.89	5443

GRUPO IV. Tiempo de tratamiento: 48 horas.



POLIAMINA	TIEMPO DE RETENCION	AREA BAJO LA CURVA
PUTRESCINA	4.45	628384
ESPERMIDINA	5.94	604644
ESPERMINA	-	-

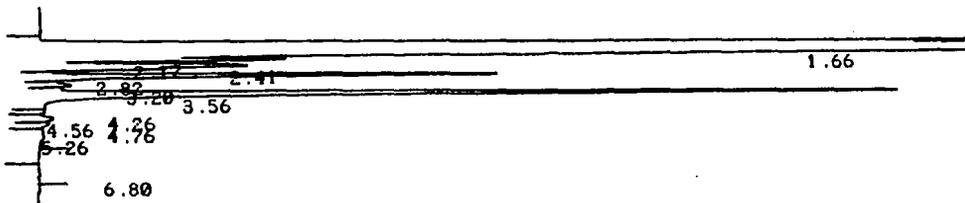
GRUPO V. Tiempo de tratamiento: 72 horas.



POLIAMINA	TIEMPO DE RETENCION	AREA BAJO LA CURVA
PUTRESCINA	3.6	1939043
ESPERMIDINA	4.14	158816
ESPERMINA	4.6	115525

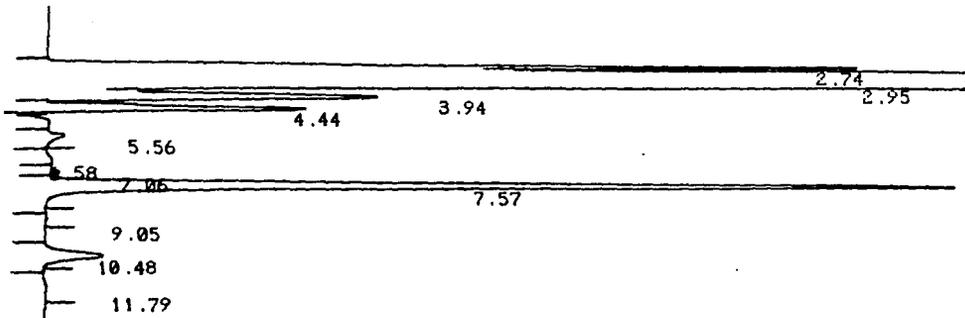
**CROMATOGRAMAS CORRESPONDIENTES A LOS GRUPOS
TRATADOS CON L-ARGININA 10mM.**

GRUPO VI. Tiempo de tratamiento: 20 minutos.



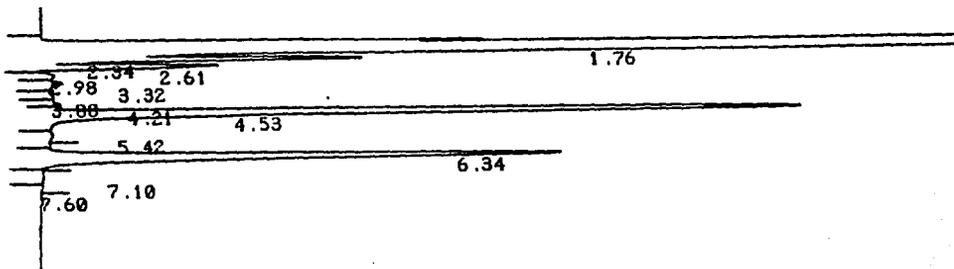
POLIAMINA	TIEMPO DE RETENCION	AREA BAJO LA CURVA
PUTRESCINA	3.56	4277269
ESPERMIDINA	4.26	31452
ESPERMINA	4.76	55305

GRUPO VII. Tiempo de tratamiento: 1 hora.



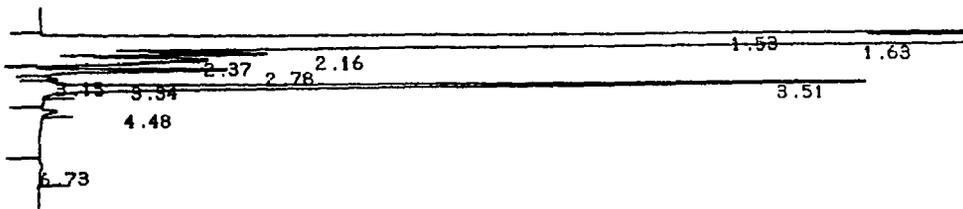
POLIAMINA	TIEMPO DE RETENCION	AREA BAJO LA CURVA
PUTRESCINA	4.44	2150127
ESPERMIDINA	5.56	144215
ESPERMINA	7.57	7438964

GRUPO VIII. Tiempo de tratamiento: 24 horas.



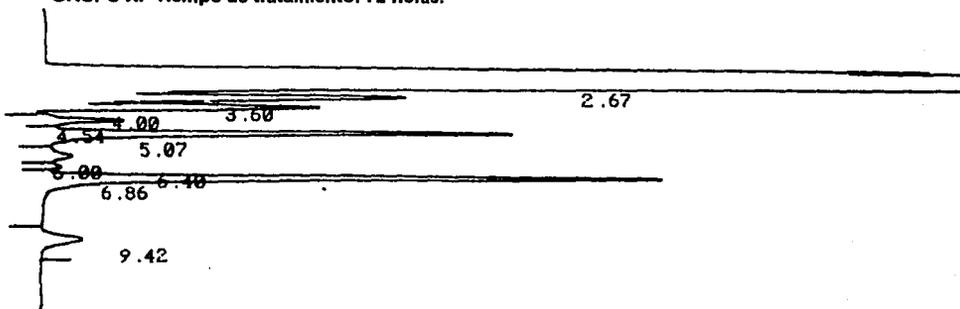
POLIAMINA	TIEMPO DE RETENCION	AREA BAJO LA CURVA
PUTRESCINA	4.53	4540720
ESPERMIDINA	5.42	16804
ESPERMINA	7.6	5534

GRUPO IX. Tiempo de tratamiento: 48 horas.



POLIAMINA	TIEMPO DE RETENCION	AREA BAJO LA CURVA
PUTRESCINA	3.51	3754039
ESPERMIDINA	4.48	75678
ESPERMINA	-	-

GRUPO X. Tiempo de tratamiento: 72 horas.



POLIAMINA	TIEMPO DE RETENCION	AREA BAJO LA CURVA
PUTRESCINA	4.54	612232
ESPERMIDINA	6.0	417014
ESPERMINA	-	-

Se corrieron tres cromatogramas de cada grupo, en este trabajo sólo se incluye uno de ellos para poder efectuar los estudios correspondientes.

ANALISIS HISTOLOGICO

Todas las muestras que se examinaron incluían epidermis y dermis. Se analizaron las muestras de los dos grupos de ratas: las tratadas con solución salina (0,9%) y las tratadas con L-arginina (10mM). Estos cortes se efectuaron a la hora, a las veinticuatro, cuarenta y ocho y setenta y dos horas después de haberse provocado la herida y seguido el tratamiento correspondiente.

A la hora de haberse producido la herida en la región abdominal de las ratas, tratadas con solución salina, se observó únicamente edema intersticial.

En las que se examinaron veintitrés horas después se observó un proceso inflamatorio agudo caracterizado por infiltración de polimorfonucleares y muy escasa cantidad de células mononucleares e histiocitos. Los vasos se encontraron dilatados durante esta etapa.

En las muestras de tejido tomadas a las cuarenta y ocho horas se observó que el infiltrado inflamatorio ya era predominantemente crónico, constituido por linfocitos y algunos histiocitos. Se observó que se iniciaba una proliferación fibroblástica y vascular.

En los cortes de setenta y dos horas, la reacción inflamatoria crónica comenzó a decrecer en tanto que la neoformación vascular era más aparente.

En los cortes histológicos del segundo grupo que comprendía los lotes de ratas tratadas con L-arginina (10 mM), se encontró que las muestras obtenidas una hora después de la inyección presentaban mayor cantidad de edema que en la contraparte tratada con solución salina (0,9%). Se observó la presencia de células mononucleares.

En el tejido extraído a las veinticuatro horas se observó una reacción inflamatoria más acentuada con predominio de polimorfonucleares y presencia de histiocitos y linfocitos.

En las muestras observadas a las cuarenta y ocho horas se notó disminución en el proceso inflamatorio, se inicia la síntesis de nueva colágena y la proliferación vascular.

En los cortes tomados a las setenta y dos horas la reacción angioblástica resultó mucho más intensa. Continuaba el proceso inflamatorio y la proliferación de colágena se disponía de manera desarreglada.

CAPITULO IV

ANALISIS DE RESULTADOS

Analizando las tablas y gráficas correspondientes a la actividad de arginasa, se observa claramente que existen diferencias significativas entre los grupos tratados con L-arginina 10mM y los tratados con solución salina 0.9% ($P=1.35 \text{ E-}24$), excepto en los correspondientes a una hora de tratamiento. El comportamiento de la enzima en ambos grupos es similar, si bien los tratados con L-arginina presentan un incremento en la actividad de arginasa en relación a los tratados con solución salina. Esto se debe a que una parte de la L-arginina administrada sirvió de sustrato para la arginasa estimulando más su actividad, mientras que los grupos tratados con solución salina sólo contenían la cantidad de L-arginina o sustrato presente en condiciones normales.

El comportamiento de la enzima varía conforme pasa el tiempo, aumentando considerablemente a los veinte minutos después de haberse producido la herida. A los sesenta minutos decae su actividad recuperándose en las horas siguientes.

Se comprobó que la L-arginina administrada estaba siendo metabolizada por la arginasa al determinarse la actividad de la enzima a los veinte minutos de haberse comenzado el tratamiento, tiempo en el cual se observa un considerable aumento en la actividad, como lo demuestra la gráfica correspondiente a la Tabla IV.

El hecho de que la arginasa presente la misma actividad enzimática a la hora de haberse producido la herida e iniciado el tratamiento en ambos grupos se considera normal. Esto puede explicarse por el hecho de que la L-arginina presente en cada grupo ya ha sido metabolizada por la arginasa, como lo demuestra el incremento en la actividad a los 20 minutos del tratamiento. Una vez que el sustrato ha sido aprovechado la actividad enzimática decrece para incrementarse ligeramente a las 24 horas, tiempo en el cual comienzan a aparecer los macrófagos que requieren, entre otros factores, de la presencia de esta enzima para ser activados.

De acuerdo con los resultados obtenidos no se observa ninguna relación existente entre el incremento en la actividad de arginasa y los niveles de poliaminas presentes durante la etapa inicial del proceso de reparación de heridas en piel de ratas hiperglucémicas.

El hecho de que se registren niveles mayores de putrescina y de que los valores de espermina sean muy bajos o difícilmente detectables, puede deberse a que durante la síntesis de poliaminas la primera molécula sintetizada es la putrescina, la cual dará origen a la espermidina, molécula precursora de la espermina, que es la última poliamina en sintetizarse.

El estudio histológico de los diferentes grupos indica que la L-arginina administrada por vía intraperitoneal provoca un aumento en la reacción inflamatoria. Se observa un predominio de la respuesta angioblástica así como de la respuesta fibroblástica como efecto directo de la L-arginina.

Los resultados obtenidos durante este trabajo, nos llevan a pensar que la L-arginina estimula la actividad de arginasa sin influir en la síntesis de poliaminas. Los cambios en la actividad de arginasa se pueden deber a que se requiere la presencia de esta enzima para la activación de macrófagos, y a ello se debe la disminución en el tiempo del proceso inflamatorio al aplicarse tratamiento con L-arginina.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

La L-arginina provoca un aumento en la respuesta angioblástica y fibroblástica, así como una reacción inflamatoria más intensa de la que se presenta en condiciones normales en una herida.

Como efecto de la administración de L-arginina, el proceso cicatrizal parece anticiparse en tiempo. Faltaría por evaluar si la cicatriz producida de esta manera conserva las características de la cicatrización normal o bien puede derivar hacia una cicatriz patológica (granuloma piógeno).

Se demostró, con las pruebas bioquímicas, que durante la etapa inicial del proceso de reparación de heridas en piel la actividad de arginasa se encuentra incrementada en relación a la piel que no presenta ningún daño.

Al administrar tratamiento con L-arginina se observan incrementos significativos en la actividad de arginasa en relación con la contraparte tratada con solución salina. Este aumento en la actividad de arginasa puede llevar a la activación de un mayor número de macrófagos, los cuales despejarán más rápidamente el área lesionada de los restos de células e infiltrado que ahí se encuentren. Esto conducirá a la proliferación más temprana de fibroblastos que llevarán a cabo la síntesis de colágena necesaria para la formación de cicatriz.

No parece existir relación entre la actividad de arginasa reportada y la síntesis de poliaminas durante la etapa inicial del proceso de reparación de heridas en piel de rata, ya que se obtienen niveles de poliaminas similares en los dos tipos de tratamientos administrados. Durante este período se detectan niveles de putrescina más altos que los de espermidina, lo que demuestra que la síntesis de poliaminas se está llevando a cabo, aunque no se ha completado hasta la etapa final donde se sintetiza la espermina.

La elevada actividad de arginasa estimula la producción de ornitina, aminoácido precursor de la síntesis de poliaminas. Al no observarse efecto directo de la enzima sobre la producción de estas moléculas, su presencia puede ser necesaria para elevar la producción de ornitina, intermediario en la síntesis de prolina. Esta última es constituyente importante en la síntesis de proteínas estructurales de la piel.

REFERENCIAS

1. Pérez-Tamayo, R. : Reparación y regeneración, en: Introducción a la Patología. Segunda Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, 1987. p.p. 236-275.
2. Valencia, J. J. y Zuñiga, E. : Cicatrización normal y patológica, en: Dermatología Clínica. Cortes, J. L. (Ed). Segunda Edición. Clínicas de Alergia, S. A. México, 1972. p.p. 831-835.
3. Breathnach, A. S., Wolff, K. : Estructura y desarrollo de la piel, en: Dermatología en Medicina General. Tomo I. Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z. (Eds) Segunda Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1980.
4. Gay, J. : Dermatología. Ed. Científico Médica. España, 1961.
5. Saúl, A. : Lecciones de Dermatología. Francisco Méndez Cervantes (Ed). Décimoprimer edición. México, 1989.
6. Velasco, P. : La piel. Su significado, en: Dermatología Clínica. Cortés, J. L. (Ed). Segunda Edición. Clínicas de Alergia, S. A. México, 1972. p.p. 866-873.
7. Piñol, J. : Fisiología de la piel y sus anexos, en: Anatomía, Histología y Embriología de la Piel. González, G. (Ed). p.p. 42-50.
8. Schuman, Ch. R. : Diabetes mellitus: definition, classification and diagnosis, in: Diabetes Mellitus. Gallorvay, J. A., Poduin, J. H. and Schuman, Ch. R. (Eds) Ninth Edition. Eli Lilly and Co. Indianapolis, Indiana, 1988. p.p. 1-13.
9. Fajans, S. S. : Classification and diagnosis of diabetes, in: Diabetes Mellitus. Rifkin, H. and Porte, D. (Eds) Fourth Edition. Elsevier. Nueva York, 1990. p.p. 346-356.
10. Jelinek, J. E. : Skin disorders associated with Diabetes Mellitus, in: Diabetes Mellitus. Rifkin, H. and Porte, D. (Eds) Fourth Edition. Elsevier Science Publishing. Nueva York, 1990. p.p. 838-849.
11. Brownlee, M. and Cerami, A. : The biochemistry of the complications of Diabetes Mellitus, Ann. Rev. Biochem., 50: 385-432, 1981.

12. Skyler, J. S. : Complicaciones de la diabetes en los 90's, en: Diabetes Mellitus. Rull, J. A. y Zorrilla, E. (Eds). Interamericana Mc Graw-Hill. México, 1992. pp. 31-44.
13. Archer, A. G., Robert, V. C. and Watkins, P. J. : Blood flow patterns in painful diabetic neuropathyc, *Diabetologia*, 27: 563-567, 1984.
14. Bailey, T. S., Yu, H. M. and Rayfield, E. J. : Patterns of foot examination in diabetic clinic, *Am. J. Med.*, 78: 371-373, 1985.
15. Chavarría, C. : Piel y glándulas de secreción interna, en: *Dermatología Clínica*. Cortéz, J. L. (Ed). Segunda Edición. Clínicas de Alergia, S. A. México, 1972. pp. 846-853.
16. Binkley, G. W. : Dermopathy in the diabetic syndrome, *Arch. Dermatol.*, 92: 625, 1963.
17. National Diabetes Data Group. : Classification and diagnosis of Diabetes Mellitus and other categories of glucose intolerance, *Diabetes*, 28: 1039-1057, 1979.
18. Fajans, S. S., Cloutier, M. C. and Crowther, R. L. : Clinical and etiological heterogeneity of idiopathic Diabetes Mellitus, *Diabetes*, 27: 1112-1125, 1978.
19. Brodoff, B. N., Bleicher, S. J. (Eds). *Diabetes Mellitus and Obesity*. Williams and Wilkins. Baltimore, 1982.
20. Groop, L. C., Bottazo, G. F. and Doniach, D. : Islet cell antibodies identify latent type I diabetes in patients aged 35-75 years at diagnosis, *Diabetes*, 35: 237-241, 1986.
21. DeFronzo, R. A., Ferrannini, E. and Koivisto, V. : New concepts in the pathogenesis and treatment of noninsulin dependent Diabetes Mellitus, *Am. J. Med.*, 74 (suppl 1A): 52-81, 1983.
22. Ríos, J. M. y Rull, J. A. : El síndrome clínico de Diabetes Mellitus, en: *Diabetes Mellitus*. Rull, J. A. y Zorrilla, E. (Eds). Interamericana Mc Graw-Hill. México, 1992. pp. 3-16.
23. Harris, M. I., Hadden, W. C., Knowler, W. C. and Bennett, P. H. : International criteria for the diagnosis of diabetes and impaired glucose tolerance, *Diabetes Care*, 8: 562-567, 1985.

24. Freinkel, N. and Josimovich, J. : Session V: Report of workshop chairmen. Workshop-conference on gestational diabetes. Summary and recommendations, *Diabetes Care*, 3: 499-501, 1980.
25. Mordes, J. P. and Rossini, A. A. : Animal models of diabetes, *Am. J. Med.*, 70: 353-360, 1981.
26. Johnson, D. D. : Alloxan administration in the Guinea pig, *Endocrinology*, 47 (6): 393-398, 1950.
27. Goldner, M. G. and Gomori, G. : Studies on the mechanism of alloxan diabetes, *Endocrinology*, 35: 241-248, 1944.
28. Méndez, J. D. : Poliaminas, en: *Bioquímica e Inmunología. Vol II.* Hicks, J. J. y Díaz Zagoya, J. C. (Eds) Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1989. p.p. 365-385.
29. Persson, L. and Heby, O. : Molecular genetics of polyamines synthesis in eukaryotic cells. Elsevier Science Publishers. LTD April, 15:153-158, 1990.
30. Tabor, C. W. and Tabor, H. : Polyamines, *Annu. Rev. Biochem.*, 53: 749-790, 1984.
31. Pegg, A. : Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes, *Biochem. J.*, 234: 249-262, 1986.
32. Pegg, A. and McCann, P. P. : Polyamine metabolism and function, *Am. J. Physiol.*, 2 y 3: C212-C221, 1982.
33. Bethell, D. R., Hibasami, H. and Pegg, A. E. : Regulation of polyamine content in cultured fibroblasts, *Am. Phys. Soc.*, C262-269, 1982.
34. El Baze, P., Milano, G., Verrando, P., Reneé, N. and Ortome, J. P. : Polyamine levels in normal human skin, *Arch. Dermatol. Res.*, 275: 218-221, 1983.
35. Rodríguez, A. C. and Nuñez, J. C. : La enzima arginasa: Bioquímica general, metabolismo, interés de la determinación sérica en patología hepática, *Rev. Clín. Esp.*, 123 (3): 213-219, 1971.

36. Caaldi, A. A. and Algranati, I. D. : Polyamines and regulation of ornithine biosynthesis in E. coli, J. Bacteriol., 171 (4): 1998-2002, 1989.
37. Cunningham, R. and Werner, K. M. : Isolation, characterization and mapping of E. coli mutants blocked in the synthesis of ornithine decarboxylase, J. Bacteriol., 124 (2): 791-799, 1975.
38. Verma, A. K. and Boutwell, R. K. : Characterization of arginase activity from mouse epidermis and its relation to ornithine decarboxylase induction by the tumor-promoting agent, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate, Bioch. Bioph. Act., 677: 184-189, 1981.
39. Redmond, A. F. and Rothberg, S. : Arginase activity and other cellular events associated with epidermal hyperplasia, J. Cell. Physiol., 94: 99-104, 1978.
40. Bernal, A., Méndez, J. D. y Rosado, A. : Determinación rápida de peso seco por colorimetría, Arch. Invest. Med. (Méx), 12: 83-88, 1981.
41. Lowry, O. H., Rosenbrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
42. Kung, J. T., Brooks, S. B., Jackwoy, J. P., Leonard, L. L. and Tamalge, D. W. : Suppresion of in vitro citotoxlc response by macrophages due to induce arginase, J. Exptl. Med., 146: 665-672, 1977.

APENDICE

DETERMINACION DE PESO SECO

FUNDAMENTO DE LA TECNICA

El ácido sulfúrico y el dicromato de potasio constituyen una mezcla capaz de oxidar a la materia orgánica, reduciéndose al mismo tiempo el cromo, de cromo (+6) a cromo (+3), lo que produce un cambio en la coloración de la solución de naranja a café oscuro.

Si se tiene una solución de esta mezcla oxidante y se pone en contacto con materia orgánica, el cambio de color producido será proporcional a la concentración de materia orgánica presente.

REACTIVOS

- A. Solución oxidante. Un gramo de dicromato de potasio en 50 ml de ácido sulfúrico concentrado. Calentar a 70 grados centígrados para disolución. Esta solución se debe preparar al momento de usarse.
- B. Estándar de manitol (2 mg/ml).

PROCEDIMIENTO

1. Colocar en los tubos de reacción 0,1 ml del homogeneizado.
2. Completar a 1 ml con agua destilada. Agregar 2 ml de la solución oxidante y agitar en el vórtex.
3. Proceder a leer la absorbancia a 660 nanómetros.
4. Al mismo tiempo preparar una curva estándar con manitol como sigue:

	MANITOL (μg)	AGUA (ml)	SOLUCION OXIDANTE (ml)
BLANCO	0	1.0	2
1	400	0.8	2
2	800	0.6	2
3	1200	0.4	2
4	1600	0.2	2
5	2000	0.0	2

DETERMINACION DE PROTEINAS

FUNDAMENTO DE LA TECNICA

La cuantificación colorimétrica de una proteína por el uso de reactivo de Folin- Ciocalteu depende de la tirosina y triptofano presentes en la proteína. El color se produce por la reducción del reactivo por los residuos de tirosina observándose una relación lineal entre la cantidad de proteína y la intensidad del color.

REACTIVOS

- A. Amortiguador. Carbonato de sodio al 2%, tartrato doble de sodio y potasio al 0.02% en hidróxido de sodio 0.1 N.
- B. Solución de sulfato de cobre pentahidratado al 0.5% en agua destilada.
- C. Reactivo de Folin-Ciocalteu en agua. (1:1).
- D. Estándar de albúmina bovina (0.2 mg/ml).
- E. Mezcla cuproalcalina (50 volúmenes de la solución amortiguadora con 1 volumen de la solución de sulfato de cobre pentahidratado). Esta mezcla se deberá preparar al momento de usarse.

PROCEDIMIENTO

1. Colocar en los tubos de reacción 0.2 ml de homogeneizado y agregar 0.2 ml de hidróxido de sodio 1 N.
2. Calentar a 37 grados centígrados durante 30 minutos.
3. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
4. Diluir el sobrenadante 1:10.
5. Tomar una alícuota de 0.2 ml.
6. Completar a 0.5 ml con agua destilada.
7. Agregar 2 ml de la mezcla cuproalcalina, mezclar y dejar reposar 10 minutos.
8. Agregar 0.2 ml del reactivo diluido de Folin-Ciocalteu, mezclar y dejar reposar 20 minutos.
9. Proceder a leer la absorbancia a 530 nm.
10. Al mismo tiempo preparar una curva estándar con albúmina bovina como sigue:

	ALBUMINA (μ g)	AGUA (ml)	MEZCLA CUPROALCALINA (ml)	REACTIVO FOLIN (ml)
BLANCO	0.0	0.5	2	0.2
1	20.0	0.4	2	0.2
2	40.0	0.3	2	0.2
3	60.0	0.2	2	0.2
4	80.0	0.1	2	0.2
5	100.0	0.0	2	0.2

DETERMINACION DE ARGINASA

FUNDAMENTO DE LA TECNICA

Para medir el contenido de urea se utiliza una modificación del método propuesto por Geyer y Dabich.

La urea forma en solución ácida de diacetil monoxima en presencia de tiosemicarbazida un complejo colorido que se mide fotométricamente.

REACTIVOS

- A. Reactivo colorido. Extracto acuoso de una solución que contiene una concentración de 2.4 mM de tiosemicarbazida y 41.1 mM de 2,3 butanediona monoxima.
- B. Reactivo ácido. 0.1 ml de cloruro férrico 0.12 M en ácido fosfórico al 56.7%, esta alícuota se lleva a un volumen de 100 ml con ácido sulfúrico al 20%. Esta solución debe prepararse al momento de utilizarse.
- C. Solución amortiguadora. Cloruro de manganeso 0.002 M, Tris-HCl 0.004 M y solución salina al 0.9%.
- D. Solución arginina-glicina. Arginina 0.4 M y glicina 0.15 M.
- E. Estándar de urea (15 microgramos/ml).

PROCEDIMIENTO

1. Colocar en los tubos de reacción 0.2 ml de homogeneizado y adicionar 0.7 ml de buffer.
2. Calentar a 55 grados centígrados durante 1 hora.
3. Adicionar 0.1 ml de la solución arginina-glicina.

4. Calentar a 37 grados centígrados durante 15 minutos.
5. Introducir en agua hirviendo durante 7 minutos.
6. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
7. Tomar una alícuota de 0.2 ml de sobrenadante.
8. Agregar 0.8 ml de agua, 1 ml del reactivo colorido y 2 ml del reactivo ácido.
9. Colocar la mezcla de reacción a 95 grados centígrados durante 25 minutos.
10. Una vez enfriados los tubos, proceder a leer la absorbancia a 530 nanómetros.
11. Al mismo tiempo preparar una curva estándar con urea como sigue:

	UREA (μ g)	AGUA (ml)	REACTIVO COLORIDO (ml)	REACTIVO ACIDO (ml)
BLANCO	0	1.0	1	2
1	1.5	0.9	1	2
2	3.0	0.8	1	2
3	4.5	0.7	1	2
4	6.0	0.6	1	2
5	7.5	0.5	1	2

DETERMINACION DE POLIAMINAS

FUNDAMENTO DE LA TECNICA

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

Estos compuestos, después de un proceso de extracción, son tratados para la formación de derivados a fin de cuantificarlos por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). El reactivo utilizado para la cuantificación de las poliaminas es el cloruro de dabsilo, y el derivado se obtiene haciendo reaccionar a las poliaminas con este compuesto en condiciones totalmente anhidras para evitar su hidrólisis.

REACTIVOS

- A. Solución de HCl 6 N.
- B. Solución de HCl 0.05 N.
- C. Estuche de reactivos para dabsilación: Dabs Amino Acid Kit de Beckman Instruments.
- D. Tetrahidrofurano grado HPLC.
- E. Agua desmineralizada y libre de compuestos orgánicos.

PROCEDIMIENTO

1. Tomar un mililitro del homogeneizado, para determinación de poliaminas, y agregar 10 microlitros de HCl 6 N.
2. Incubar 1 hora a 37 grados centígrados.

3. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos.
4. Recolectar el sobrenadante y realizar tres enjuagues al precipitado con agua desmineralizada y libre de compuestos orgánicos, centrifugando en cada uno de los enjuagues.
5. Evaporar a sequedad el sobrenadante a 60-70 grados centígrados.
6. Recuperar el residuo con 500 microlitros de HCl 0.05 N.
7. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos.
8. Tomar una alícuota de 10 microlitros del sobrenadante y evaporar a sequedad en ampollitas para 1 mililitro.
9. Reconstituir un vial del reactivo de dabsilación (4b) con 1 ml del solvente (4a).

PRECAUCION: Este líquido contiene acetonitrilo y es tóxico e inflamable. Manéjese con cuidado.

10. Tapar nuevamente el vial, mezclar suavemente y dejar reposar 5 minutos. Agitar en el vórtex antes de usar.
11. Abrir una ampollita del buffer de dabsilación (3). Agregar cuidadosamente 20 microlitros de éste a cada una de las ampollitas que contienen el problema, blanco y estándar.
12. Adicionar 40 microlitros del reactivo de dabsilación reconstituido (4) en cada ampollita.
13. Sellar las ampollitas.
14. Calentar las ampollitas a 70 grados centígrados durante 12 minutos..

Después de 1 minuto, mezclar los tubos suavemente en el vórtex. Verificar que todo el material sólido esté completamente disuelto y que la solución presente una coloración rojiza. Mezclar nuevamente en el vórtex, después de 4 minutos la solución debe ser naranja. Después de 12 minutos debe ser amarillo-naranja.

15. Enfriar las ampollas durante 5 minutos. Aforar a 500 microlitros con el buffer de dilución (5) (este buffer puede formar cristales en un ambiente frío, si hay cristales formados, entibiálo suavemente para disolverlos). Tapar las ampollas y mezclar suavemente. Las muestras deben ser almacenadas en forma diluida. El buffer de dilución contiene etanol, manéjese con cuidado.

16. Las muestras, estándares y blancos están listos para el análisis en HPLC. Las soluciones diluidas de aminoácidos dabsilados son estables por lo menos dos semanas si permanecen tapadas a temperatura ambiente, y hasta seis meses a 4 grados centígrados. Las muestras almacenadas pueden formar cristales, los cuales deben redisolverse calentando ligeramente la muestra antes de la inyección.

NOTA: El reactivo de dabsilación contiene cloruro de dabsilo y acetonitrilo, manéjense los desechos de la solución con cuidado.

17. Después de preparada la muestra, tomar una alícuota de 10 microlitros e inyectarla al aparato de HPLC, previamente preparado. Fase móvil tetrahidrofurano (THF) grado HPLC. Se procede a correr la cromatografía a una longitud de onda de 436 nanómetros.