

300627
46
2EJ



UNIVERSIDAD LA SALLE

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

**“Poliaminas y Función
Pancreática”**

TESIS PROFESIONAL
Que para obtener el Título de
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P r e s e n t a
Guadalupe Vértiz Serrano

Director de Tesis:
D. en C. JOSE D. MENDEZ FRANCISCO

México, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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.

AUNQUE HABLARA LA LENGUA DE LOS HOMERES
Y DE LOS ANGELES, SI NO TENGO AMOR,
SOY COMO BRONCE QUE SUENA O CIMBALO
QUE RETINE.
Y AUNQUE TUVIERA EL DON DE PROFECIA,
Y CONOCIERA TODOS LOS MISTERIOS
Y TODA LA CIENCIA;
AUNQUE TUVIERA TODA LA FE
COMO PARA TRANSLADAR MONTAÑAS,
SI NO TENGO AMOR, NADA SOY.

1 Corintios 13: 1-2

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
CAPITULO 1: PANCREAS.....	3
1.1 GENERALIDADES.....	4
1.1.1 Anatomía del páncreas.....	4
1.1.2 Relaciones del páncreas con otros órganos.....	6
1.2 PANCREAS EXOCRINO.....	7
1.2.1 Acini.....	7
1.3 PANCREAS ENDOCRINO.....	8
1.3.1 Ontogenia del páncreas endocrino.....	8
1.3.2 Islotes de Langerhans.....	9
1.3.3 Glucosa.....	13
1.3.3.1 Transportadores de glucosa.....	14
1.3.4 Insulina.....	19
1.3.4.1 Dinámica de la secreción de insulina.....	19
1.3.4.2 Síntesis de insulina.....	20
1.3.4.3 Receptor de insulina.....	24
1.3.5 Regulación del transporte de glucosa.....	26
CAPITULO 2 : DIABETES MELLITUS.....	30

2.1	CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA.....	31
2.2	DIABETES MELLITUS.....	33
2.2.1	Tipo I: Diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM).....	33
2.2.2	Tipo II: Diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM).....	34
2.2.3	Diabetes mellitus asociada a desnutrición (MRDM).....	37
2.2.4	Otros tipos de Diabetes mellitus.....	38
2.3	DESAJUSTES EN LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA (IGT).....	39
2.4	DIABETES GESTACIONAL (GDM).....	40
2.5	CLASES DE RIESGO ESTADISTICO.....	41
2.5.1	Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa (PreAGT).....	41
2.5.2	Anormalidad potencial de tolerancia a la glucosa (PotAGT).....	43
CAPITULO 3:		
	POLIAMINAS.....	44
3.1	LAS POLIAMINAS COMO REGULADORES DE LAS FUNCIONES CELULARES.....	45
3.2	METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS.....	50
3.3	REGULACION DEL METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS.....	53
3.3.1	Regulación de la Ornitina descarboxilasa.....	53
3.3.2	Inhibición de las enzimas que biosintetizan poliaminas.....	54
3.4	INTERACCIONES DE LAS POLIAMINAS CON LOS ACIDOS NUCLEICOS.....	56
3.5	CITOTOXICIDAD DE LAS POLIAMINAS.....	57

CAPITULO 4:	
INHIBICION FARMACOLOGICA	
DE LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS.....	59
4.1 D, L - ALFA-DIFLUOROMETIL ORNITINA.....	62
4.2 APLICACIONES DE D,L - ALFA-DIFLUOROMETIL	
ORNITINA.....	62
4.3 CINETICA DE D,L - ALFA-DIFLUOROMETIL	
ORNITINA.....	66
4.4 PROBLEMAS EN LOS ESTUDIOS CON	
D, L - ALFA-DIFLUOROMETIL ORNITINA.....	69
4.5 D, L - ALFA-DIFLUOROMETIL ORNITINA	
Y PANCREAS.....	71
CAPITULO 5:	
POLIAMINAS Y CELULA BETA.....	73
5.1 EL PAPEL DE LAS POLIAMINAS EN LA	
PRODUCCION Y SECRECION DE INSULINA.....	74
5.2 LAS POLIAMINAS COMO MENSAJEROS	
EN LA LIBERACION DE INSULINA.....	77
5.3 POLIAMINAS Y PROLIFERACION	
DE LA CELULA BETA.....	81
5.3.1 Contenido nuclear de poliaminas.....	82
5.3.2 Las poliaminas como reguladores	
de la fosforilación de proteínas.....	83
5.4 POLIAMINAS Y CELULAS DE INSULINOMA RINm5F.....	85
CONCLUSIONES.....	88
REFERENCIAS.....	89

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Vista frontal del páncreas.....	5
Figura 2.	Representación de una sección transversal del abdomen en el área lumbar superior.....	6
Figura 3.	Anatomía fisiológica del páncreas.....	10
Figura 4.	Transportador de glucosa.....	15
Figura 5.	Transporte de glucosa a través de la membrana... ..	17
Figura 6.	Síntesis de insulina.....	21
Figura 7.	Mecanismos que regulan la proliferación B pancreática "in vitro".....	23
Figura 8.	Modelo de receptor de insulina.....	25
Figura 9.	Modelo de la acción de la insulina a nivel celular y molecular.....	27
Figura 10.	Nombres y fórmulas de las poliaminas principales.....	45
Figura 11.	Fórmulas de otras poliaminas estudiadas.....	46
Figura 12.	Biosíntesis de poliaminas y su interconversión en células de mamífero.....	51
Figura 13.	Mecanismo de inactivación irreversible de ornitina descarboxilasa por D, L-alfa-difluorometil ornitina.....	61
Figura 14.	Concentraciones plasmáticas de DFMO.....	68

INDICE DE TABLAS

TABLA I.	CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS	32
TABLA II.	CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA.....	34
TABLA III.	CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA (continuación).....	35
TABLA IV.	CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA (continuación).....	37
TABLA V.	CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA (continuación).....	38
TABLA VI.	CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA (continuación).....	39
TABLA VII.	CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA (continuación).....	41
TABLA VIII.	CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA (continuación).....	42
TABLA IX.	EFFECTOS BIOLOGICOS DE LAS POLIAMINAS.....	48
TABLA X.	INHIBIDORES DE LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS.....	55

RESUMEN

Las poliaminas son cationes orgánicas ampliamente distribuidos y sintetizados tanto por procariontes como por eucariontes, están relacionadas estrechamente a la síntesis macromolecular, proliferación y diferenciación celular.

La inhibición de la biosíntesis de poliaminas con agentes específicos como la D, L - alfa-difluorometil ornitina (DFMO) ha permitido estudiar la función fisiológica de estas moléculas, y ha demostrado ser útil en el tratamiento de enfermedades en las cuales hay que detener la rápida proliferación celular.

Recientemente se ha estudiado la función de estas moléculas en la célula beta. Las altas concentraciones de poliaminas en estas células y su asociación con los gránulos secretores sugieren que las poliaminas tienen un papel significativo en el almacenamiento o secreción de insulina. Por lo cual resulta de gran interés estudiarlas en este contexto ya que pudieran estar involucradas en los estados diabéticos (deficiencia de poliaminas).

INTRODUCCION

La Diabetes mellitus es una enfermedad caracterizada por una deficiencia absoluta o relativa de insulina, la hormona clave en el mantenimiento de la normoglucemia. A pesar de las intensas investigaciones con el objeto de entender la etiología de esta compleja enfermedad, los mecanismos moleculares causantes de este desorden aún son desconocidos. Para conocer mejor los factores patogenéticos, es necesario primero tener una visión completa de los mecanismos que normalmente mantienen la homeostasis de la glucosa. Debido a que la insulina es producida y secretada al torrente sanguíneo exclusivamente por las células beta de los islotes pancreáticos es lógico considerar una disfunción de estas células como un caso posible para el desarrollo de la diabetes (78).

CAPITULO 1
PANCREAS

GENERALIDADES

ANATOMIA DEL PANCREAS

El páncreas (Figura 1) es una glándula compuesta, que se encuentra situada paralela al estómago y detrás de él, presenta una función secretoria endocrina y exocrina de hormonas necesarias para el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Su estructura comprende dos tipos principales de tejidos: los acini, responsables de la secreción exocrina y los islotes de Langerhans, responsables de la secreción endocrina; ambas regulan la homeostasis en humanos por acciones opuestas de sus productos de secreción (42).

El páncreas es un órgano de corteza rosada que a simple vista se observa característicamente lobulado. El tejido conectivo que lo reviste proporciona la segmentación que origina estos lóbulos macroscópicos; los cuales se componen de muchos lóbulos microscópicos que son las unidades funcionales del páncreas exocrino. El peso húmedo del órgano es de aproximadamente 100g en hombres, 85 gramos en mujeres y 5g en el recién nacido. La glándula adulta mide de 14 a 18cm de largo, de 2 a 9cm de ancho y de 2 a 3cm de espesor. Está dividida en cuatro regiones: cabeza, cuello, cuerpo y tallo. El mayor contenido de masa se concentra en la cabeza.

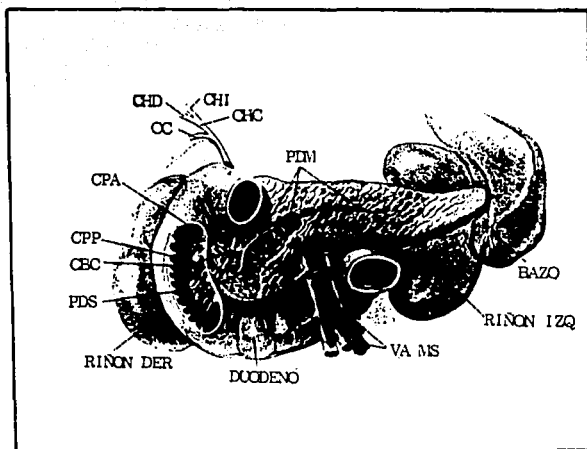


Figura 1. Vista frontal del páncreas. Conducto pancreático principal, CPP; conducto biliar común, CBC; papila duodenal superior, PDS; conducto hepático derecho, CHD; conducto hepático izquierdo, CHI; conducto hepático común, CHC; conducto cístico, CC; vena y aorta mesentéricas superiores, VA MS; conducto pancreático accesorio, CPA; papila duodenal menor, PDM.

RELACIONES DEL PANCREAS CON OTROS ORGANOS

La cabeza del páncreas está íntimamente relacionada al duodeno. El cuerpo y el tallo al bazo. El páncreas y el duodeno descansan detrás del peritoneo anterior a la vértebra lumbar superior. Las superficies posterior o dorsal del páncreas y del duodeno están relacionadas, sin la intervención del peritoneo, los riñones se encuentran a la izquierda y a la derecha (Figura 2). Las superficies anterior o ventral del páncreas y el duodeno están cubiertas con peritoneo excepto a lo largo de la sección de origen del mesocolón transversal. La parte anterior del páncreas está relacionada a la parte posterior del estómago (6).

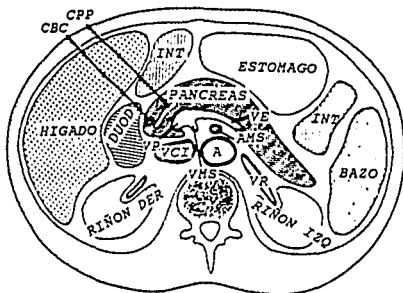


Figura 2. Representación de una sección transversal de abdomen en el área lumbar superior. Intestino, INT; duodeno, DUOD; aorta, A; vena cava inferior, VCI; arteria mesentérica superior, AMS; vena portal hepática, VP; vena mesentérica superior, VMS; vena esplénica, VE; vena renal izquierda, VR; conducto pancreático principal, CPP; conducto biliar común, CBC.

PANCREAS EXOCRINO

Cada lóbulo pancreático microscópico está compuesto por una proporción considerable de células que sintetizan enzimas digestivas y que almacenan como gránulos zimógenos (células acinares) y de una proporción más pequeña de células que comprenden el sistema de conductos intralobulares e intercalados (6).

ACINI

Los acini son grupos de células que secretan enzimas digestivas en forma de jugo pancreático hacia las porciones altas del intestino delgado en respuesta a la presencia del quimo (10, 39).

El jugo pancreático contiene enzimas que hidrolizan proteínas, carbohidratos y grasas, además de iones bicarbonato importantes para la neutralización del quimo ácido provenientes del estómago hacia el duodeno (23, 39). Las principales enzimas presentes en el jugo pancreático son:

a) Enzimas proteolíticas:

- Tripsina
- Quimotripsina
- Carboxipolipeptidasa
- Rinonucleasa
- Desoxirribonucleasa
- Inhibidor de tripsina

b) Enzimas digestivas de carbohidratos:

- Amilasa pancreática

c) Enzimas lipídicas:

- Lipasa pancreática
- Esterasa del colesterol
- Fosfolipasa

PANCREAS ENDOCRINO

El páncreas endocrino de los mamíferos está constituido de grupos de células secretoras de hormonas que están dispersas a lo largo del tejido exocrino. Estos islotes endocrinos fueron primero descritos por Langerhans en 1869. Sin embargo, después del descubrimiento de que perros pancreatomeclizados desarrollaban Diabetes mellitus, se sugirió que estos islotes podían producir un factor antidiabético. Esta hipótesis fue confirmada, y asumió gran importancia clínica cuando Banting y Best obtuvieron un extracto pancreático activo de insulina que fue usado para tratar a un paciente diabético. Ahora está claro que los islotes de Langerhans son unas estructuras muy complejas que contienen diferentes tipos de células secretoras de hormonas, células nerviosas y un rico suministro vascular (41).

ONTOGENIA DEL PANCREAS ENDOCRINO

Las células alfa que contienen glucagón, pueden ser identificadas en el embrión a las 9 semanas. Las células delta que contienen somatostatina y las células beta que contienen insulina aparecen un poco después. Además, el páncreas endocrino fetal en esta etapa presenta células que contienen polipéptido pancreático gástrico, serotonina, norepinefrina y epinefrina. Se ha sugerido que estos islotes degeneran al quinto mes de gestación en conjunción con un proceso de infiltración linfocítica, y que el páncreas endocrino permanente surge de una segunda generación de islotes que aparecen primero durante el tercer mes de gestación.

En el adulto sano, el páncreas contiene más de 1,000,000 de islotes. El origen exacto del desarrollo de las células de los islotes pancreáticos no se conoce. De acuerdo a Pearce las células de los islotes pertenecen a la familia de las células endocrinas y neuronales que constituyen el llamado sistema APUD C (precursor del consumo y descarboxilación de aminas).

Un rasgo característico de las células APUD es la captación de 3,4 - dihidrofenilalanina (DOPA) y 5 - hidroxitriptofano (5HTP) y su descarboxilación por una L-aminoácido descarboxilasa. Esta enzima es expresada permanentemente en el páncreas endocrino, en las células epiteliales de la placa basal del cerebro y en la médula espinal, pero sólo se encuentra transitoriamente durante el desarrollo fetal en el páncreas exocrino.

Estudios con ratones transgénicos establecen una estrecha relación embriológica entre las células de los islotes y las células nerviosas. Estas observaciones sugieren que la célula beta es o de origen neural o comparte características regulatorias similares con las de las células neuronales que dejan sitio para la coexpresión de proteínas que son ordenadas por los elementos regulatorios del gen de insulina. También se señala la existencia de un precursor común de las células maduras endocrinas pancreáticas (41).

ISLOTES DE LANGERHANS

Las células de los islotes de Langerhans (Figura 3) en general se caracterizan por presentar un alto grado de compartimentalización, dado por un gran contenido de retículo endoplasmático rugoso (RER), aparato de Golgi y polisomas; también sus mitocondrias son extremadamente pequeñas en comparación de las mitocondrias de otras células, además de contener numerosos cuerpos ceroides autofluorescentes que contienen enzimas lipídicas y lisosomales.

Las células pancreáticas endocrinas están altamente diferenciadas y presentan las características que las conducen a realizar funciones especializadas. Los islotes contienen varios tipos de células (10, 41, 42), las cuales son: células

alfa, células beta, células delta, células PP, células C, E y F (42).

Células alfa: Este tipo de células secretan la hormona llamada glucagon, cuya función es la de aumentar la concentración sanguínea de glucosa, ya que esta hormona provoca la hidrólisis del glucógeno hepático y muscular e incrementa la gluconeogénesis, lo que aumenta la disponibilidad de la glucosa para los otros organelos del cuerpo. Las células alfa son más pequeñas que las células beta y poseen gránulos uniformes electrodensos que almacenan el glucagon, estas células comprenden aproximadamente el 20-25% de la población de células en el islote de mamíferos adultos.

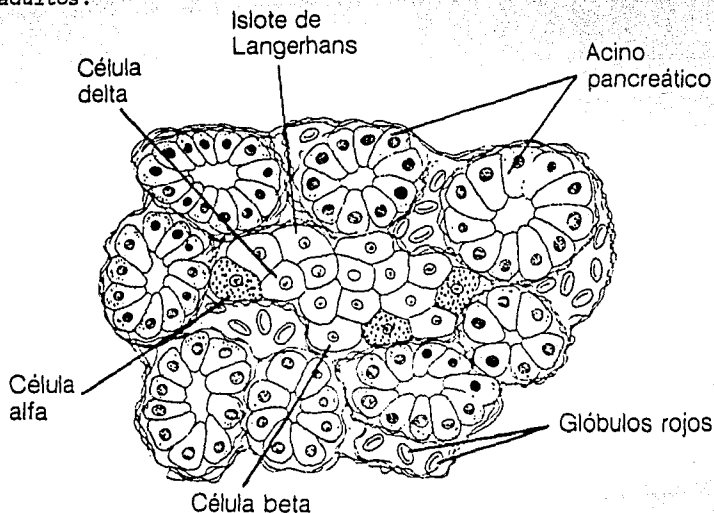


Figura 3. Anatomía fisiológica del páncreas

Células beta: Las células beta poseen la morfología típica de una célula secretora endocrina, son las encargadas de sintetizar insulina, la cual es almacenada dentro de gránulos de forma heterogénea que tienen núcleos electrodensos. La insulina promueve la absorción en el hígado de la glucosa ingerida almacenándose en forma de glucógeno, lo anterior se debe a que esta hormona promueve varios mecanismos a nivel enzimático que provocan este efecto.

Este tipo de células, tienen un alto grado de compartimentalización la cual está dada por los gránulos secretorios o gránulos beta, el aparato de Golgi y el RER. Los gránulos beta derivan del RER a través del aparato de Golgi, siendo estos gránulos los que contienen y secretan la insulina.

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

Células delta: Estas células son pequeñas, 250-450nm, tienen frecuentemente forma dendrítica, constituyen cerca del 10% del total de la población celular de los islotes y son las encargadas de secretar la hormona somatostatina.

Células PP: Las células PP son un tipo de células que se encuentran en los islotes en pequeñas cantidades y secretan una hormona llamada polipéptido pancreático (PP). Estas células tienen gránulos de figura oblonga muy electrodensos. La función del polipéptido pancreático se cree que es la de regular ciertas funciones gastrointestinales, ya que se ha descubierto que regula la liberación de enzimas digestivas pancreáticas (10, 41, 42).

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

Todos los tipos celulares descritos anteriormente están relacionados estrechamente, lográndose con esto la regulación directa de la secreción de algunas hormonas por medio de otras también producidas en los islotes, como el glucagon que inhibe la secreción de insulina, o la somatostatina, la cual a su vez inhibe la secreción tanto de insulina como de glucagon (42).

GLUCOSA

La glucosa desempeña un papel clave en la liberación de insulina y es capaz de potenciar la acción de los otros secretagogos. El metabolismo del azúcar parece ser necesario para la liberación de esta hormona, como se infiere de los estudios en los que se obtuvo una respuesta secretoria atenuada a la glucosa empleando manoheptulosa, la cual inhibió la glucólisis ocasionando la falta de liberación de insulina en presencia del azúcar no metabolizado. La ruta principal del metabolismo de la glucosa involucra la fosforilación por hexocinasa y glucocinasa, más adelante la conversión a piruvato por la vía glucolítica y el subsecuente metabolismo oxidativo (78, 99).

Debido a que la glucosa necesita ser metabolizada para ejercer sus efectos, los factores generados en su metabolismo pueden estar mediando dichos efectos. La glucosa es el principal regulador del gen de insulina y se considera que este nutrimento incrementa los contenidos del mRNA de insulina tanto "in vitro" como "in vivo" (99). Itoh y Okamoto (36) demostraron que la biosíntesis de insulina estimulada por glucosa a corto plazo tiene lugar sin un incremento correspondiente en el mRNA de insulina. Esto quiere decir que la glucosa estimula de forma aguda la biosíntesis de insulina incrementando la eficacia de la traducción de este mRNA. En contraste, a largo plazo, la glucosa parece promover la transcripción del mRNA de insulina, lo que está de acuerdo con los resultados de Brunstedt y Chan (7) quienes observaron que los islotes mantenidos por varios días en una alta concentración de glucosa contuvieron diez veces más mRNA de insulina que los cultivados en baja concentración. El efecto estimulador de la glucosa sobre la transcripción del gen de insulina puede en parte, ser mediado por AMPc, el cual se ha reportado que ejerce una estimulación preferencial en la transcripción de dicho gen (78).

La absorción de la glucosa es más compleja de lo que se supone, se requiere de una proteína especial; un transportador (43).

TRANSPORTADORES DE GLUCOSA

Hasta ahora se han descubierto cinco formas moleculares de transportadores, cada uno adaptado a las necesidades metabólicas del tejido en el cual se encuentran.

El primer transportador fue aislado en 1977 de los eritrocitos humanos (células rojas) por Michihiro Kasahara y Peter C. Hinkle de la Universidad de Cornell. Ocho años más tarde se determinó la secuencia de aminoácidos del transportador. La proteína consiste de una cadena de 492 aminoácidos que se organizan en 25 segmentos. 13 segmentos son extremadamente hidrofílicos por lo que se encuentran en los ambientes acuosos extracelulares e intracelulares. Estos segmentos están alternados con 12 segmentos hidrofóbicos que están en el ambiente lipídico de la membrana celular. Este arreglo y la información química directa sobre las partes protéicas que se encuentran en las superficies interior y exterior del eritrocito, sugieren que la proteína zigzaguea hacia afuera y hacia adentro a través de la membrana 12 veces. (Figura 4).

Para que esta estructura transporte a la glucosa a través de la célula tiene que abrir un poro a través de la membrana.

La evidencia experimental sugiere que la molécula de glucosa entra a la célula en 4 pasos:

1. La molécula ocupa el sitio externo de unión al transportador.

2. El complejo transportador-glucosa cambia de conformación, de esta forma la glucosa ocupa ahora el sitio de enlace que da al interior de la célula.

3. El transportador libera a la glucosa al citoplasma de la célula.

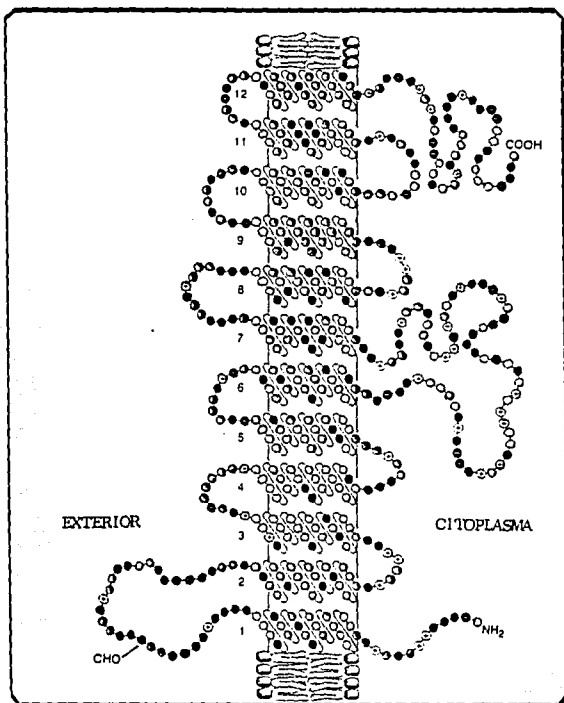


Figura 4. Transportador de glucosa. Estructura propuesta para los 492 aminoácidos del transportador de glucosa. 12 segmentos de la cadena atraviesan la membrana lipídica.

4. El transportador no ocupado cambia a la conformación en la cual el sitio de enlace para la glucosa mira hacia el exterior. Este paso final retorna al transportador a su forma inicial, permitiéndole transportar otra molécula de glucosa (Figura 5).

No se conocen las estructuras de las dos conformaciones, pero parece probable que en cada conformación el poro está abierto en un extremo y contraído en el otro y que la glucosa se une en la cavidad del extremo abierto. La glucosa es entonces removida cuando el extremo abierto cierra detrás de ésta y el extremo contraído se abre en frente de ésta.

Cuando la glucosa está ausente, cada molécula de transportador en la membrana de un eritrocito pasa a sus dos estados conformacionales aproximadamente 100 veces por segundo a 20°C. Cuando la glucosa está unida al transportador, la velocidad es más grande, aproximadamente 900 veces por segundo.

Cada transportador de glucosa (GluT) se ha numerado en el orden de su descubrimiento. El primero, GluT1, se expresa en altos niveles en las células del endotelio, esa línea de vasos sanguíneos que forman la barrera entre el cerebro y la sangre.

El GluT2 se presenta en órganos que liberan glucosa en la sangre, tales como el intestino delgado, el hígado y el riñón; y en las células beta del páncreas (no se encuentran en otro tipo de células en el islote).

El GluT3 se encuentra en las neuronas cerebrales. Debido a que tiene una afinidad más alta que la de GluT1, este transportador asegura un movimiento constante del azúcar a estas células. Un transportador de glucosa de esta manera coopera con otro, garantizando el flujo de este nutrimento vital al interior de las células del cerebro.

El GluT4 es el transportador principal en el músculo y en las células adiposas, las cuales toman la glucosa en

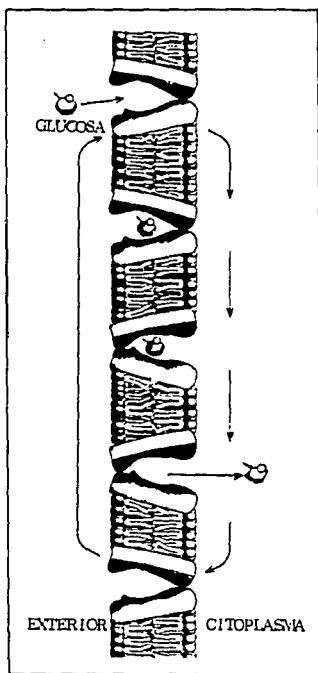


Figura 5. Transporte de glucosa a través de la membrana. La glucosa entra a la célula por unión a un transportador el cual se encuentra en una conformación de cara hacia afuera. En seguida el transportador se reconfirma cerrando el poro externo y abriéndolo hacia el citoplasma. La glucosa entonces se separa.

grandes cantidades y la convierten a otros componentes energéticos.

El GluT5 se encuentra principalmente en el riñón e intestino delgado. Su función no se ha descrito aún en detalle.

Los transportadores varían en la manera de responder a la insulina. De esta forma cada transportador está adaptado a las necesidades metabólicas del tejido en el cual se encuentra. La respuesta más marcada del efecto de insulina sobre el transportador de glucosa la tiene GluT4.

Debido a que el transportador de glucosa es una proteína embebida en la membrana dentro y en la superficie de la célula, seguramente migra como parte de una vesícula membranosa. Probablemente la insulina induce a las vesículas intracelulares que contienen GluT4 a trasladarse a la superficie de la membrana celular y fundirse con ella. (43).

INSULINA

DINAMICA DE LA SECRECION DE INSULINA

En el estado basal, la secreción de insulina de la célula beta es generalmente constante. La importancia de la secreción basal de insulina y de los cambios diurnos en los requerimientos de insulina para la regulación de la homeostasis de la glucosa en la actualidad es ampliamente aceptada; parte como resultado de la investigación realizada con sistemas pancreáticos artificiales. Sin embargo, la secreción basal de insulina también presenta pequeñas oscilaciones, con una periodicidad de 9 a 14 minutos.

El principal regulador de la secreción de insulina de la célula beta pancreática es la glucosa. La liberación de insulina estimulada por glucosa es bifásica durante las dos primeras horas. La primera fase es rápida pero pasajera, la liberación de insulina ocurre en respuesta a un cambio inicial de la concentración de glucosa. Es independiente de la síntesis de insulina, y se debe a la secreción de insulina de los gránulos previamente formados que están localizados cerca de la membrana de la célula beta. La segunda fase está asociada con un incremento más gradual en la secreción de insulina durante un periodo de aproximadamente dos horas, los niveles de insulina aumentan por encima de los vistos durante la primera fase y declinan lentamente de ahí en adelante. Esta fase es parcialmente dependiente de la liberación de la insulina recientemente sintetizada (41).

SINTESIS DE INSULINA

El control del metabolismo de la glucosa y de la energía en los humanos depende considerablemente de las hormonas secretadas por los islotes de Langerhans, y más específicamente de la insulina. El gen de la insulina humana está localizado en el cromosoma 6. Contiene 3 exones y 2 intrones. La insulina es producida a partir de la preproinsulina, por un mecanismo de síntesis de proteínas ordinario (Figura 6), el cual comienza en el núcleo, con la activación del gen presente en el DNA, que determina la composición de la preproinsulina, transcribiéndose en la banda de otro ácido nucleico, el RNA que origina y procesa a su vez el RNAM que se exporta al citoplasma celular, sirviendo como molde para la síntesis de la proteína en los ribosomas (10, 40, 41).

El RNAM de insulina se traduce a preproinsulina, un péptido de 110 aminoácidos que tiene una secuencia señal de 24 aminoácidos, los péptidos A y B y un péptido de conexión C. Posteriormente la secuencia señal se pierde dando lugar a la proinsulina, esto ocurre por peptidasas de señal.

La proinsulina sufre un proceso de acomodamiento y oxidación de grupos sulfhidrilo de las cisteínas presentes para formar puentes disulfuro que proporcionan la actividad y conformación característica de la molécula de insulina.

La proinsulina es entonces almacenada en el aparato de Golgi y procesada a insulina madura en los gránulos de secreción recubiertos liberados de la transfase del aparato de Golgi (40).

La regulación de la biosíntesis de insulina es coordinada por varias hormonas y nutrientes, siendo la glucosa la más importante (Figura 7). La síntesis de insulina se incrementa de forma considerable dentro de los minutos de exposición de la célula beta a la glucosa "in vitro", como resultado de eventos de transcripción y postranscripción. La activación de la transcripción del gen de la insulina es dependiente de la presencia de secuencias que flanquean al extremo 5' que contienen las regiones promotoras de este gen,

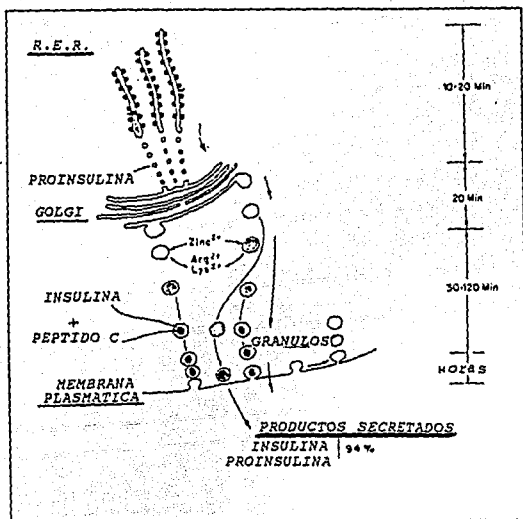


Figura 6. Síntesis de insulina. El mRNA de preproinsulina conduce a la formación de preproinsulina en los polirribosomas, posteriormente pasa a proinsulina en el retículo endoplasmático. La proinsulina es entonces transferida al aparato de Golgi donde es convertida a insulina y almacenada en los gránulos secretores. (R.E.R. retículo endoplasmático rugoso).

incluyendo una sección TATA y las secciones FAR y NIR. Estas secuencias de DNA son regiones importantes que funcionan para regular el sitio de iniciación de la transcripción del gen y la velocidad de la síntesis transcripcional. Las secciones FAR y NIR ordenan la expresión específica del gen de insulina y contienen el sitio de iniciación de la transcripción GCCATCTG que interactúa con la unión de una proteína I que resalta la síntesis de insulina (IEF), una proteína unida al DNA.

A fin de que la glucosa ejerza sus efectos sobre la secreción de insulina y su síntesis, debe primero entrar a la célula beta. Esto se realiza a través de un proceso de difusión facilitada, el cual es mediado por un transportador de glucosa (10, 41).

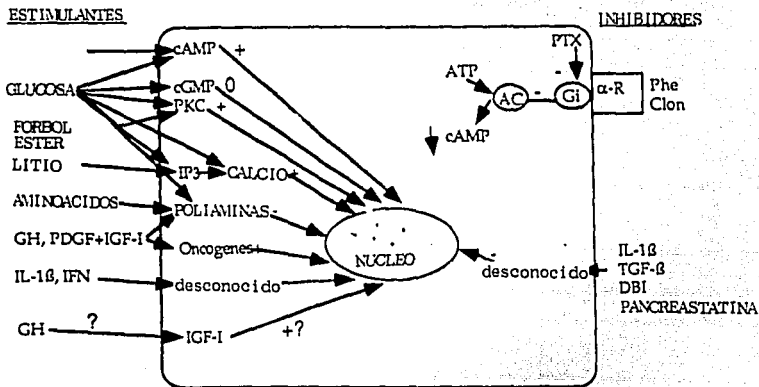


Figura 7. Mecanismos que regulan la proliferación B pancreática "in vitro". Las flechas indican acciones estimulantes (+) o inhibitoras (-) en la proliferación celular. Cero indica sin efecto, mientras que ? denota efecto indefinido (78). AC, Adenil ciclasa; α -R, alfa adrenérgico; Clon, clonidina; DBI, inhibidor de la fijación del diazepam; GH, hormona del crecimiento; Gi, proteína inhibidora de la fijación de GTP; IFN, interferón gama; IGF-I, factor I de crecimiento parecido a la insulina; IL-1 β , interleucina 1 β ; IP3, inositol trifosfato; PDGF, factor de crecimiento derivado de las plaquetas; Phe, fenileprina; PKT, proteinoquinasa C; PTX, toxina pertussis; TGF- β , factor B de transformación del crecimiento.

RECEPTOR DE INSULINA

La clonación del receptor de insulina ha revelado su estructura molecular y ha hecho posible la disección de los elementos que contribuyen al mecanismo de traducción. Han sido caracterizados dos cDNAs casi idénticos que contienen el prorreceptor de la insulina humana. Estos DNAs codifican una secuencia de 1370 aminoácidos y otra de 1382 aminoácidos respectivamente, incluyendo un residuo peptídico señal de 27 aminoácidos.

El polipéptido receptor maduro es una gran lipoproteína de transmembrana, compuesta por 2 subunidades alfa de 135KDa y dos subunidades beta de 95KDa unidas por enlaces disulfuro para formar un heterotetrámero B- α - α -B. (Figura 8). Ambas subunidades derivan de la molécula de un precursor monocatenario que contiene la secuencia completa de subunidades alfa y beta, separadas por un sitio de procesamiento que consiste en cuatro aminoácidos básicos.

Estas subunidades están especializadas para cumplir las dos funciones del receptor. Las subunidades alfa son totalmente extracelulares y contienen el dominio que se fija a la insulina, mientras que las subunidades beta son proteínas de transmembrana que poseen actividad de tirosina proteínquinasa. Luego de que la insulina ha sido fijada, los receptores se agregan y son internalizados rápidamente. Dado que los anticuerpos antiinsulina bivalentes forman uniones cruzadas entre receptores adyacentes y semejan las acciones rápidas de la insulina, se ha sugerido que la agregación de los receptores es esencial para la traducción de la señal. Luego de la internalización, el receptor puede ser disgregado o reciclado hacia la superficie celular (30).

Las acciones de la insulina se inician con su fijación al receptor presente en la superficie celular que se encuentra en casi todas las células de los mamíferos. Entre ellas se incluyen las clásicas células efectoras de la acción de la insulina (hígado, músculo y tejido adiposo) y otros efectores no clásicos como células sanguíneas circulantes, cerebro y

células gonadales. El número de receptores varía desde sólo unos 40 por célula en los eritrocitos hasta 300 000 por célula en los adipositos y hepatocitos (37).

Cuando la insulina se une a la célula, desencadena una cascada de eventos moleculares que esencialmente redistribuyen los transportadores de la glucosa en la membrana celular. Solamente el comienzo y el final de esta cascada se conocen. Da inicio cuando una proteína de la sangre se une a una proteína específica embebida en la membrana celular. La proteína se proyecta de uno a otro lado de la membrana. Cuando la insulina se une a la proyección externa, el receptor se reconforma, permitiendo a la proyección interna colocar un grupo fosforilo sobre el aminoácido tirosina en sitios específicos dentro de las proteínas blanco específicas (43).

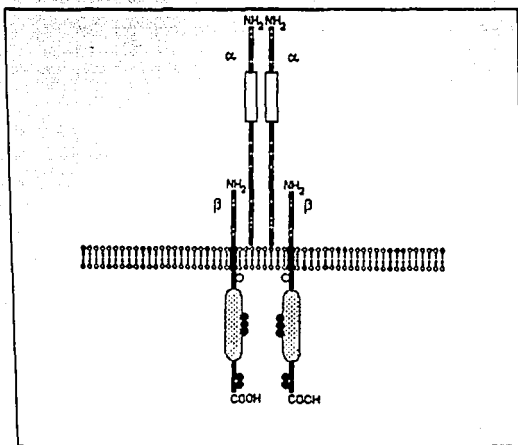


Figura 8. Modelo de receptor de insulina. El receptor de insulina es una estructura heterotetramérica. Las 2 subunidades alfa y las 2 subunidades beta están unidas por enlaces bisulfuro.

REGULACION DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA

La estimulación del transporte de glucosa hacia el músculo y el tejido adiposo es un componente esencial de la respuesta fisiológica a la insulina. La activación del transporte por la insulina requiere ATP y es rápido e independiente de la síntesis proteica. La insulina no estimula la captación de glucosa por el hígado y otros tejidos, a pesar de que estos últimos poseen receptores de insulina y responden a la hormona de otra forma.

La insulina estimula el transporte de glucosa promoviendo la translocación, que requiere energía, de las vesículas intracelulares que contienen proteínas portadoras de glucosa hacia la membrana plasmática (Figura 9). Este efecto es reversible; los transportadores retornan a las reservas intracelulares luego de la separación de la insulina. En algunos tejidos (p. ej. músculo) la insulina estimula la actividad intrínseca de las moléculas transportadoras además de facilitar su translocación. La insulina también regula la síntesis de los transportadores de glucosa; este fenómeno puede ser particularmente importante cuando existe una deficiencia prolongada de insulina, como en pacientes con Diabetes mellitus tipo 1 (37).

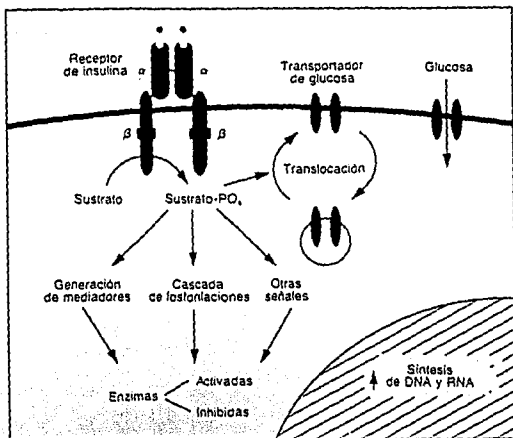


Figura 9. Modelo de la acción de la insulina a nivel celular y molecular. La insulina se fija a las subunidades alfa de su receptor y estimula la actividad de la tirosina quinasa de las subunidades beta. Esto da como resultado la autofosforilación de varios residuos de tirosina del receptor de insulina y estimula aún más la actividad de la quinasa. Las presuntas consecuencias de estas reacciones incluyen cascadas de fosforilaciones de proteínas, generación de posibles mediadores de la acción de la insulina y otras señales que finalmente dan como resultado los efectos característicos de la insulina sobre el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas.

En resumen, el efecto estimulante de la glucosa está mediado por una combinación del incremento en la transcripción del gen de insulina y una estabilización selectiva de mRNA de insulina contra la degradación.

Por otra parte, los mecanismos que controlan la liberación de insulina son desviados por un complejo lote de señales que llegan a los islotes, por ej. nutrimentos y hormonas transportadas vía sanguínea, suministro de terminales nerviosas circundantes e influencias paracrinas de las células vecinas a los islotes. La evidencia hasta ahora acumulada es que la secreción de insulina está regulada estrechamente por diferentes sistemas de señales intracelulares incluyendo hidrólisis de fosfoinositol, incrementos en el Ca^{2+} citosólico y generación de AMPc (41, 78).

La capacidad de los islotes pancreáticos para responder a un nivel elevado de glucosa en sangre con una secreción incrementada de insulina depende de una fina regulación minuto a minuto de la maquinaria secretoria de insulina por células individuales, pero también depende de adaptaciones a largo plazo del total de la masa de las células beta. Puesto que estudios previos han establecido un respuesta secretoria defectuosa de las células beta para la glucosa así como una disminución de la masa de dichas células en pacientes diabéticos; la investigación de los factores que intervienen en la producción y proliferación de las células beta sanas está justificada. Además los factores hereditarios son de importancia patogénica para el desarrollo de la diabetes, es posible que algunos pacientes diabéticos tengan una limitación genéticamente determinada de la capacidad replicatoria de las células beta que puede llegar a manifestarse clínicamente durante los períodos de incremento en la demanda funcional endocrina en el páncreas (obesidad y embarazo). Puede ser también que tal efecto genético interfiera con el desarrollo adecuado de la población de las células beta o que se dañe la diferenciación funcional durante la vida fetal.

Algunas moléculas como las poliaminas están relacionadas estrechamente a la proliferación celular y biosíntesis macromolecular, sin embargo, hasta ahora han sido poco estudiadas en la célula beta.

La importancia de estudiar las poliaminas en el páncreas radica en que estas moléculas podrían ejercer un papel fisiopatológico en los estados diabéticos (deficiencia de poliaminas) (78).

CAPITULO 2
DIABETES MELLITUS

La Diabetes mellitus es una alteración del metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas determinada genéticamente, asociada con una insuficiencia absoluta o relativa de la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a esta hormona. En su expresión clínica totalmente desarrollada se caracteriza por hiperglucemia en el ayuno, y en la mayoría de los pacientes a largo plazo por complicaciones vasculares microangiopáticas, especialmente en el ojo y el riñón, por una frecuencia aumentada de enfermedad macrovascular, tales como enfermedad coronaria y vascular periférica, y por neuropatía. Aunque las principales diferencias fenotípicas en tipos de diabetes clínica (tipo de presentación juvenil, tipo de aparición en la madurez) han sido apreciadas desde hace un siglo, es hasta hace unos doce años que se incrementa el conocimiento de la etiología y patogénesis de la diabetes. La diabetes no es una entidad simple sino un grupo heterógeno de alteraciones.

La heterogeneidad implica que hay diferencias entre varios grupos de pacientes en términos de etiología y patogénesis (factores genéticos, medioambientales e inmunes), en la historia natural, y en la respuesta al tratamiento. Por lo que se considera que la diabetes no es una simple enfermedad sino un síndrome. Fajans (15) ha dado la clasificación de la diabetes más reciente basada esencialmente en el trabajo y procedimientos del Grupo Nacional de Datos de Diabetes (NDDG) y de los grupos de trabajo de la Organización Mundial de la Salud con ligeras modificaciones.

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

La clasificación (Tabla I) incluye tres clases clínicas:

1. La Diabetes mellitus se caracteriza 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.

2. Un deterioro en la tolerancia a la glucosa se caracteriza por niveles de glucosa plasmática durante una prueba de tolerancia a la glucosa que cursan por arriba de lo normal pero por abajo de aquellos definidos como diabetes.

3. La tercera clase clínica es la diabetes gestacional.

La clasificación también incluye dos clases de riesgo estadístico en la historia natural de la diabetes para propósitos de investigación solamente en los cuales no hay anomalías del metabolismo de carbohidratos. Hay anomalía previa de tolerancia a la glucosa, y anomalía potencial de la tolerancia a la glucosa.

La clasificación se ha diseñado de modo que un individuo pueda ser clasificado solamente en una de estas clases, sin embargo, un paciente puede cambiar de una clase a otra en la historia natural de la enfermedad.

En esta descripción se indica entre paréntesis la nomenclatura internacional que se emplea en la designación de cada clase de diabetes.

TABLA I
CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS

Clases Clínicas
A. Diabetes Mellitus (DM)
I. Tipo I. Tipos dependientes de insulina (IDDM)
II. Tipo II. Tipos No-dependientes de insulina (NIDDM)
III. Diabetes Mellitus relacionada a desnutrición (MROM)
IV. Otros tipos. Incluyen diabetes mellitus asociada con ciertas condiciones y síndromes
B. Desajustes en la Tolerancia a la Glucosa (IGT)
C. Diabetes Gestacional (GDM)
Clases de riesgo estadístico

DIABETES MELLITUS

La Diabetes mellitus (DM) está subdividida en cuatro diferentes tipos que parecen definir la etiología y patogénesis.

TIPO I: DIABETES MELLITUS INSULINO DEPENDIENTE (IDDM)

La Diabetes mellitus tipo I o insulino dependiente (IDDM) se presenta en aproximadamente el 10% de todos los diabéticos en el mundo occidental.

Se piensa que los factores genéticos son de importancia en la mayoría de los pacientes como lo expresa el aumento asociado (o disminución) de la frecuencia de ciertos locus de antígenos de histocompatibilidad (HLA) sobre el cromosoma número 6. En el tipo más común de IDDM (tipo IA), se ha postulado que factores medioambientales como ciertas infecciones virales y posiblemente agentes químicos sobrepuestos sobre los factores genéticos pueden conducir a una destrucción de las células beta mediada por células. Clásicamente, este tipo de enfermedad ocurre más comunemente en la niñez y en la adolescencia (tipo IA) (Tabla II); sin embargo, se puede reconocer y puede sobrevenir asintómicamente a cualquier edad. Generalmente hay una aparición sintomática repentina secundaria a una severa insuficiencia de insulina (poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, fatiga), una predisposición a la cetosis, y el paciente se adelgaza. La dependencia de insulina implica que la administración de insulina es esencial para prevenir la cetosis espontánea, coma y muerte. Además de la etapa de predisposición a la cetosis, este tipo de enfermedad se puede reconocer en una etapa más temprana sintomática o asintomática antes de que el paciente llegue a ser cetósico.

El segundo tipo de diabetes insulino dependiente (tipo IB) es menos común y se presenta aproximadamente en 10% de todos los casos de IDDM. Se ha pensado que la autoinmunidad primaria está involucrada en la patogénesis de esta forma de diabetes tipo I (Tabla II). Tales pacientes tienen enfermedad endocrina autoinmune asociada, tal como tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, enfermedad de Addison, falla

gonadal primaria y enfermedad autoinmune asociada no endocrina, tales como anemia perniciosa, enfermedades del tejido conectivo y miastenia gravis, entre otras.

TIPO II: DIABETES MELLITUS NO INSULINO DEPENDIENTE (NIDDM).

El segundo tipo de diabetes, tipo II o Diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM), se presenta aproximadamente en el 90% de los diabéticos del mundo occidental, también tiene unas bases genéticas que comúnmente se expresan con un patrón familiar más frecuente de ocurrencia que el que se ve en la IDDM. La sobreposición de factores medioambientales a la susceptibilidad genética está indudablemente también involucrada en la evolución de la NIDDM. Los pacientes con diabetes tipo II pueden tener un peso corporal que varía de normal a excesivo; la NIDDM ha sido subclasificada de acuerdo a su asociación con la obesidad (Tabla III). El consumo excesivo de calorías que conduce a la ganancia de peso y a la obesidad y la resistencia a la insulina son factores importantes en la patogénesis de la NIDDM en la mayoría de los pacientes occidentales (60 a 80%).

TABLA II
CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clase clínica	Subclases	Etapas en la historia natural o evolución	Otra información o explicación
A. Diabetes mellitus (DM)			
I. Tipo I. Tipos dependientes de insulina (IDDM)		1. Predisposición a la precetosis	Anticuerpos positivos, Isiote-cE lula (ICA)
	a. Tipo IA: Clásica	a. Diabéticos GTT	
	b. Tipo IB. Autoinmune primaria	b. Hiperglicemia en el ayuno	
		2. Predisposición a la cetosis. Dependiente de insulina	Autoanticuerpos positivos contra insulina (IAA)
		(principales formas clínicas de diabetes)	

En la mayoría de los pacientes con diabetes tipo II se hace un diagnóstico a mediana edad. Una subclase de NIDDM incluye familias en las cuales la diabetes se puede reconocer en niños, adolescentes y adultos jóvenes, la cual se ha designado como tipo de diabetes juvenil que aparece en la edad adulta (MODY) (Tabla III). La herencia autosómica dominante de la diabetes ha sido establecida en la MODY; la mayor parte de la NIDDM no se hereda de esta manera.

TABLA III

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS
DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clase clínica	Subclases	Etapas en la historia natural o evolución	Información adicional o explicación
A. Diabetes Mellitus			
11. Tipo II. Tipos no dependientes de insulina (NIDDM)			
	a. NIDDM en el obeso	1. No hay requerimiento de insulina *	
	b. NIDDM en el no obeso	a. Diabético GTT b. Hiperglicemia en el ayuno	
	c. MODY-NIDDM en el joven más herencia dominante autosómica	2. Requerimiento de insulina *	MODY: Tipo de diabetes juvenil que aparece en la edad adulta (Maturity-onset type diabetes of young people)

* Principales formas clínicas de diabetes

Los pacientes con MODY frecuentemente son no obesos, particularmente en grupos de edades más jóvenes, aunque la obesidad ocurre en otros grupos en una frecuencia de 25 a 55%.

Los pacientes con NIDDM son no dependientes de insulina para la prevención de cetosis (por ejemplo, ellos son cetosis-resistentes o no predispuestos a cetosis) pero pueden requerir insulina para la corrección de la hiperglucemia del ayuno persistente sintomática o no sintomática si ésta no se puede lograr con el uso de dieta o agentes orales.

DIABETES MELLITUS ASOCIADA A DESNUTRICION (MRDM)

La diabetes relacionada a desnutrición (MRDM) se presenta en algunas partes del mundo con menos frecuencia que la IDDM y se puede aproximar a la frecuencia de la NIDDM. La mayor parte de casos se localizan en la India y ciertas partes de Africa. Se presenta generalmente en la gente joven y se caracteriza por desnutrición proteínica severa y enflaquecimiento, en algunos pacientes por la presencia de cálculos pancreáticos. (Tabla IV). La diabetes de estos pacientes se caracteriza por marcada hiperglucemia que no se acompaña por cetosis. Estos individuos requieren insulina para la preservación de su salud, aunque no dependen de insulina para la prevención de cetosis (15).

TABLA IV

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clase clínica	Subclases	Etapas en la historia natural o evolución	Información adicional o explicación
A. Diabetes Mellitus (DM)			
III. Diabetes mellitus relacionada a la desnutrición (MRDM)*	a. Diabetes pancreática fibrocalcúlosa b. Diabetes por deficiencia de proteínas		Depende de insulina para vivir, no para prevenir cetosis

* Principal forma clínica en regiones de Africa, Asia y el Caribe

OTROS TIPOS DE DIABETES

Otros tipos de diabetes incluyen entidades secundarias o asociadas con otras condiciones o síndromes (Tabla V). Esta subclase puede ser dividida de acuerdo a las conocidas o sospechadas relaciones etiológicas. La diabetes puede ser secundaria a una enfermedad pancreática o a la remoción del tejido pancreático; secundaria a enfermedad endocrina, tal como acromegalia, síndrome de Cushing, feocromocitoma, glucagonoma, somatostatina y aldosterismo primario; secundaria a la administración de ciertos fármacos. La diabetes (o deterioro en la tolerancia a la glucosa) puede estar asociada con un gran número de síndromes genéticos. Finalmente, la diabetes puede estar asociada con efectos genéticos de receptores de insulina, los cuales pueden ser el resultado ya sea de anomalías en el número o afinidad de receptores de insulina o debido a anticuerpos para receptores de insulina con o sin alteraciones inmunes asociadas.

TABLA V

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clase clínica	Subclases	Etapas en la historia natural o evolución	Información adicional o explicación
A. Diabetes Mellitus (DM)			
IV. Otros tipos, incluyen diabetes mellitus asociada con ciertas condiciones y síndromes			
		1. Enfermedad pancreática	
		2. Etiología hormonal	
		3. Inducción química o por fármacos	
		4. Ciertos síndromes genéticos	
		5. Anomalías en el receptor de insulina	
		6. Otras condiciones diversas	

DESAJUSTES EN LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA (IGT)

El NDDG de los Estados Unidos ha recomendado que sea establecida una categoría para individuos que en ayuno tienen niveles de glucosa sanguínea y niveles durante la prueba de tolerancia a la glucosa que cursan entre lo normal y la diabetes. En algunos individuos un desajuste en la tolerancia a la glucosa puede representar una etapa en la historia natural de la IDDM, y mucho más frecuentemente de NIDDM como se ha demostrado por ensayos prospectivos. En tales pacientes la conversión de tolerancia deteriorada a la glucosa a NIDDM, y particularmente a NIDDM con hiperglucemia en el ayuno, ha tomado años o décadas. Se ha encontrado que ocurre en 10% a 50% de los pacientes con desajustes en la tolerancia a la glucosa después de unos 10 años. Para estos pacientes se ha establecido la categoría de desajustes o deterioro en la tolerancia a la glucosa (IGT) (Tabla VI).

TABLA VI

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clase clínica	Subclases	Etapas en la historia natural de la enfermedad o evolución	Información adicional o explicación
B. Desajustes en la tolerancia a la glucosa (IGT)	<ul style="list-style-type: none"> a. IGT en el obeso b. IGT en el no-obeso c. IGT en el MODY d. IGT asociada con ciertas condiciones y síndromes: <ul style="list-style-type: none"> 1. Enfermedad pancreática 2. Etiología hormonal 3. Inducida por drogas o químicamente 4. Ciertos síndromes genéticos 5. Anormalidades en el receptor de insulina 6. Otras condiciones diversas 		Anticuerpos positivos, isloete-célula en DM tipo I

Aunque clínicamente están ausentes importantes complicaciones de la diabetes en riñón y retina (microangiopatía) o muy rara en pacientes con IGT, muchos estudios han mostrado en tales grupos un aumento en la tasa de muerte e incremento en la prevalencia de enfermedad arterial, anomalías electrocardiográficas o incrementada susceptibilidad a enfermedad aterosclerótica asociada con otros factores de riesgo conocidos, entre los que se incluye hipertensión, hiperlipidemia y adiposidad. De modo que el desajuste en la tolerancia a la glucosa, particularmente en aquellos individuos alrededor de los 50 años de edad (condiciones apropiadas para el uso de pruebas de tolerancia a la glucosa) pueden tener implicaciones pronósticas, deberían no ser ignorados o tomados a la ligera. En el obeso, los desajustes en la tolerancia a la glucosa casi invariablemente reversion a tolerancia normal a la glucosa con reducción en el peso. El deterioro en la tolerancia a la glucosa puede también asociarse con las condiciones y síndromes enlistados en la sección Otros Tipos de Diabetes (Tabla V).

DIABETES GESTACIONAL (GDM)

Las pacientes con Diabetes mellitus gestacional (GDM) muestran intolerancia a la glucosa durante el embarazo (Tabla VII). Una persona diabética que se llega a embarazarse no se clasifica como GDM. Desde un punto de vista bioquímico (niveles plasmáticos de glucosa) el desajuste a la tolerancia a la glucosa durante el embarazo es similar pero no idéntico a la IGT. 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. La terapia de este grado de intolerancia a la glucosa puede prevenir mucho de esto. La diabetes gestacional generalmente retorna a un estado de tolerancia normal después del parto; aún así, 60% de tales mujeres desarrollan diabetes dentro de los 15 años posteriores. Así que, después de la terminación del embarazo, las pacientes con diabetes gestacional deberían ser reclasificadas como pacientes de tolerancia deteriorada a la glucosa, Diabetes mellitus, o anomalía previa de tolerancia a la glucosa (29).

TABLA VII

**CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS
DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA**

Clase clínica	Subclases	Etapas en la historia natural de la enfermedad o evolución	Información adicional o explicación
C. Diabetes gestacional			Puede ser precursora de la diabetes tipo II o tipo I

CLASES DE RIESGO ESTADISTICO

Hay sujetos con tolerancia a la glucosa normal que han tenido una alteración de la tolerancia en el pasado (diabetes, IGT o GDM), o quienes tienen una relación genética estrecha con un diabético y tienen un alto riesgo de desarrollar diabetes en el futuro, para clasificar estos individuos inicialmente desde un punto de vista de investigación, se establecieron dos clases de riesgo estadístico por el NDDG: (1) Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa (PreAGT), y (2) Anormalidad potencial de tolerancia a la glucosa (PotAGT) (Tabla VIII).

ANORMALIDAD PREVIA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (PreAGT)

La clasificación de anormalidad previa de tolerancia a la glucosa (PreAGT) está restringida a individuos que previamente tuvieron hiperglucemia diabética o desajustes en

la tolerancia a la glucosa pero que actualmente su tolerancia es normal. Las mujeres que han tenido diabetes gestacional pero han vuelto a la normalidad después del parto son ejemplos, como los son los individuos que fueron obesos y cuya diabetes o deterioro en la tolerancia a la glucosa retornó a lo normal después de la pérdida de peso. Los pacientes con tolerancia alterada a la glucosa o diabetes media de la forma NIDDM, particularmente entre familias de tres o más generaciones de diabéticos heredados en una forma autosómica dominante (MODY), puede fluctuar entre tolerancia disminuida a la glucosa, diabetes, y normal (PreAGT), con poco o sin cambio en el peso. Se han descrito remisiones espontáneas de diabetes tipo I pero son generalmente de naturaleza temporal. Todos estos individuos tienen un riesgo incrementado de desarrollar diabetes en el futuro.

TABLA VIII

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS
DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Clases clínicas	Subclases	Etapas en la historia natural o evolución	Información adicional o explicación
Clases de riesgo estadístico			
A. Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa (PreAGT)			
B. Anormalidad potencial de tolerancia a la glucosa (PotAGT)			Anticuerpos islote-célula positivos, primera fase disminuida de la respuesta de insulina en DM tipo I.

ANORMALIDAD POTENCIAL DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (PotAGT).

Los individuos en la clase de anomalía potencial de tolerancia a la glucosa (PotAGT) nunca han exhibido tolerancia anormal, pero han incrementado sustancialmente el riesgo para el desarrollo de la diabetes. La PotAGT identifica el intervalo de tiempo desde la concepción hasta la primera demostración de intolerancia a la glucosa en un individuo predispuesto a diabetes sobre bases genéticas. Los factores asociados con un riesgo incrementado para IDDM incluyen los que son hermanos o gemelos de un paciente con IDDM, teniendo halotipos de histocompatibilidad idénticos a aquellos de un pariente de primer grado IDDM, particularmente un hermano, que posea anticuerpos circulantes islote-célula y autoanticuerpos contra insulina y una respuesta disminuida a la insulina en la primera. Los factores asociados con riesgo incrementado para NIDDM incluyen un pariente de primer grado de un diabético tipo II, particularmente en una familia de MODY, obesidad asociada con una historia familiar de diabetes, una mujer con antecedentes de haber tenido un hijo con un peso al nacimiento de más de 4 kilos y de ser miembro de un grupo racial o étnico con alta prevalencia de diabetes (ej. ciertas tribus de indios americanos o habitantes de las islas del Pacífico). Un riesgo particularmente grande para desarrollar NIDDM es ser gemelo monocigótico de un paciente NIDDM o un hijo de dos padres diabéticos NIDDM. Se ha encontrado concordancia de la diabetes en más del 90% de pares de hermanos monocigóticos de pacientes NIDDM (15).

CAPITULO 3
POLIAMINAS

LAS POLIAMINAS COMO REGULADORES DE LAS FUNCIONES CELULARES

Las poliaminas son cationes orgánicos ampliamente distribuidos y sintetizados tanto por procariontes como por eucariontes, están relacionados estrechamente a la síntesis macromolecular, proliferación celular y diferenciación en una multitud de sistemas celulares de mamíferos.

La putrescina, espermidina y espermina constituyen el grupo de poliaminas que ha sido más estudiado (Figura 10).

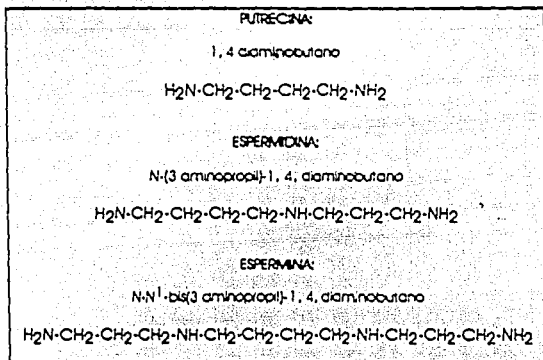


Figura 10. Nombres y fórmulas de las poliaminas principales.

Estas aminas, además de encontrarse en forma de bases alifáticas libres, pueden existir conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos y péptidos, también como unidades subestructurales dentro de numerosas familias de alcaloides (21, 32, 33, 55).

Existen otras aminas las cuales son menos comunes y se encuentran principalmente en plantas y bacterias (Figura 11) (68).

DIAMINAS	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 1-3 Diaminopropano
	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ Cadaverina
TRIAMINAS	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ Norespermidina
	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ Aminopropilcadaverina
	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ Hormoespermidina
TETRAMINAS	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ Norespermina
	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ Termoespermina
	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ Canavalmina
PENTAMINAS	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ Caladopentamina
	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ Homocaladopentamina

Figura 11. Fórmulas de otras poliaminas estudiadas.

Las poliaminas están ampliamente distribuidas en sistemas biológicos, aunque las concentraciones relativas de putrescina, espermidina y espermina varían notablemente en células diferentes.

En general, los procariontes tienen más altas concentraciones de putrescina que de espermidina y carecen de espermina.

Los eucariontes tienen generalmente bajas concentraciones de putrescina y tienen espermidina y espermina (21, 55).

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 puede obtenerse a partir de agmatina, que a su vez es producida por la descarboxilación de arginina.

A pH fisiológico estas aminas alifáticas de bajo peso molecular están cargadas, teniendo de 2 a 4 cargas positivas, una característica que les permite interactuar con varios sustratos celulares ácidos. De este modo la espermina es capaz de interactuar fuertemente con los grupos fosfato cargados negativamente en la pequeña hendidura del DNA y así estabilizar el ácido nucleico manteniendo sus dos hebras juntas. Tales interacciones directas con poliaminas han sido también descritas para RNA y ciertos fosfolípidos y se cree que la mayor parte de los efectos biológicos de las poliaminas se deben a dichas interacciones por cargas (21, 32, 33, 55, 78).

Se ha demostrado en muchos sistemas celulares que las poliaminas son necesarias para el crecimiento óptimo; en la mayoría de las células esta necesidad es absoluta (Tabla IX).

La actividad de la ODC experimenta un incremento marcado que origina una acumulación rápida de poliaminas en sistemas con crecimiento rápido como crecimiento embrionario, crecimiento tumoral e incremento en la actividad secretoria de las glándulas endocrinas. Este aumento en la actividad de la ODC, frecuentemente estimulado por las hormonas en sus tejidos blancos, es uno de los eventos más tempranos que ocurre durante la transición de las células del letargo a la proliferación activa (21, 47, 78).

La ODC es una enzima extremadamente lábil, se encuentra en las células en estado fisiológico de latencia en niveles bajos, generalmente representa el 0.0001% del total de proteína celular (34).

TABLA IX
EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS POLIAMINAS

1.	<p>Poliaminas como factores del crecimiento:</p> <ul style="list-style-type: none"> - En microorganismos - En células de mamíferos
2.	<p>Estabilización de membranas celulares.</p>
3.	<p>Estabilización de partículas subcelulares.</p>
4.	<p>Asociación con ácidos nucleicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estabilización del DNA contra la desnaturalización térmica. - Asociación con tRNA. - Estabilización de la forma superenrollada del DNA. - Empacamiento del DNA en bacteriófagos. - Estimulación de la síntesis de DNA y de tRNA. - Modificación de la actividad de ribonucleasas. - Estabilización del RNA recién sintetizado.
5.	<p>Efectos sobre la síntesis de proteínas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fijación de moléculas de tRNA a ribosomas. - Estimulación de la metilación del tRNA. - Reemplazamiento de Mg^{2+} en la reacción de la aminoacil tRNA sintetasa. - Asociación con ribosomas. - Biogénesis de partículas ribosomiales. - Iniciación y fidelidad de la traducción. - Estimulación de la nucleotidiltransferasa de tRNA.
6.	<p>Efectos sobre reacciones metabólicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estimulación de nucleotidilcinasas. - Modificación de las actividades de proteincinasas. - Incremento de la ADP-ribosilación de proteínas nucleares. - Activación de fosforilasa o. - Estimulación de la lipólisis. - Activación de coenzimas. - Incremento en la utilización de fructosa en espermatozoides (eudicimo). - Inhibición de ATPasa. - Modificación de la actividad de acetilcolina esterasa. - Inhibición de la agregación de plaquetas. - Estimulación del metabolismo de estradiol en microsomas de hígado.

La ODC tiene, quizá, la vida media más corta conocida para una enzima de mamífero, alcanzando de 7 a 15 minutos. El incremento dramático temprano en la actividad de esta enzima en las fases iniciales de la rápida proliferación celular es diferente del comportamiento de la mayoría de las otras enzimas de mamíferos. La ODC parece equilibrar el incremento rápido y transitorio, el cual podría disparar el proceso crítico en la proliferación celular y síntesis de proteínas (47).

Las poliaminas han sido implicadas en la regulación de la transcripción y la traducción del RNA. Parecen estar involucradas en varios pasos de la síntesis y destino metabólico fundamental de éste. Estas aminas participan estimulando la RNA polimerasa y el alargamiento de la cadena de RNA así como la regulación de la inhibición de las ribonucleasas. A parte, se ha encontrado que las poliaminas influyen en la biosíntesis de proteínas por regulación ribosomal, fidelidad de la traducción, e iniciación y elongación de la cadena de polipéptidos. En un sistema libre de células se encontró que la síntesis de proteínas se detuvo por adición de anticuerpos de espermina, un efecto que solamente fue vencido por espermina, indicando así que esta poliamina ejerce un papel específico en la síntesis de proteínas (78).

METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS

La ornitina es un aminoácido que a diferencia de los otros normalmente no se utiliza en la síntesis de proteínas. No está representado por ningún triplete en el código genético y no es reconocido por ningún RNA de transferencia (tRNA) específico, sin embargo, participa en tres vías metabólicas muy importantes.

a) La ornitina es metabolizada vía ciclo de Krebs por medio de la ornitina transaminasa con la formación resultante de dióxido de carbono y agua.

b) La ornitina es también un intermediario en el ciclo de la urea, siendo convertido por ornitina transcarbamilasa a citrulina, la cual es transformada subsecuentemente en argininosuccinato, arginina y urea.

c) La tercera vía metabólica donde la ornitina participa es la biosíntesis de las poliaminas (47).

La ornitina es el primer sustrato para la biosíntesis de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina. La ornitina es descarboxilada por ornitina descarboxilasa (ODC EC 4.1.1.17) para formar putrescina, y esta reacción es la primera y el paso limitante en la biosíntesis de las poliaminas.

La enzima ornitina descarboxilasa requiere de fosfato de piridoxal para catalizar la formación de putrescina. La segunda enzima crítica es la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC; EC 4.1.1.50) que controla la síntesis de espermidina y espermina, esto lo hace descarboxilando S-adenosilmetionina (SAM), la cual sirve como un donador del grupo aminopropilo para las aminopropiltransferasas espermidina sintasa (EC 2.5.1.16) y espermina sintasa (EC 2.5.1.22) (21, 32, 33, 47, 55, 78).

La biosíntesis de poliaminas se describe esquemáticamente en la Figura 12.

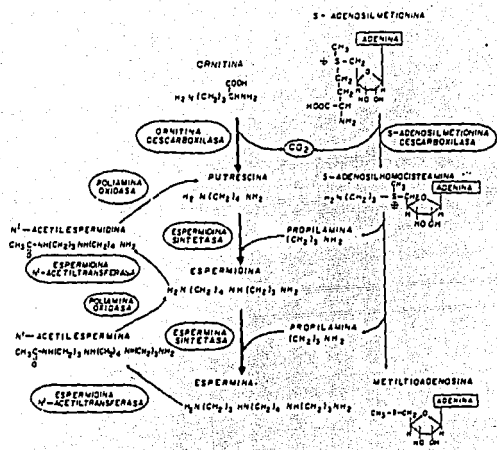


Figura 12. Biosíntesis de poliaminas y su interconversión en células de mamífero.

Una vez que SAM es descarboxilada es virtualmente inactivada como sustrato en las reacciones de transmetilación.

Las vidas medias biológicas de ODC y SAMDC son de las más cortas conocidas para las enzimas de los mamíferos (5-30 min) y sus actividades están sujetas a una estimulación rápida y poderosa por un amplio orden de estímulos tróficos. En determinadas condiciones cuando las células están expuestas a sustancias tóxicas hay una activación característica de la vía de interconversión (Figura 12) lo que resulta en la formación de espermidina a partir de espermina y putrescina a partir de espermidina por medio de las acciones de poliamina acetiltransferasa y poliamina oxidasa. La putrescina puede ser oxidada por diamino oxidasa a gama-aminobutiraldehído, el cual puede ser transformado por oxidación a gama-aminobutirato (GABA) o ser convertido a 2 pirrolidona y 5-hidroxi 2-pirrolidona. El GABA también puede formarse a partir de la putrescina por acetilación microsomal de la diamina seguida de una oxidación por monoamina oxidasa (21, 55, 78).

REGULACION DEL METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS

La biosíntesis y degradación de poliaminas pueden ser controladas en una forma muy compleja. Existen varios mecanismos de regulación operando en los niveles de transcripción, traducción y postraducción. La corta vida media de la ODC y su alto grado de inducibilidad hacen posible para las células un incremento rápido de sus niveles de poliaminas en respuesta a estímulos diferentes. La actividad de la ODC normalmente se agota aproximadamente a las 4 horas después de la estimulación mitogénica. Esto es seguido por los incrementos correspondientes en los niveles de poliaminas; las vidas medias de las poliaminas normalmente son de 1 a 6 semanas. En la mayoría de los casos el incremento en la actividad de la ODC se debe a un aumento de la proteína enzimática, lo cual resulta de una razón elevada de síntesis y, ocasionalmente se correlaciona con un incremento en el contenido del mRNA. A parte de la estimulación de la ODC y de la SAMDC por factores de crecimiento, las poliaminas también parecen ser importantes reguladores por retroalimentación. De esta forma cuando el contenido intracelular de poliaminas se incrementa, las actividades de la ODC y SAMDC se suprimen. Esto ocurre como resultado de un decremento en la proteína enzimática debido tanto a los valores de síntesis reducidos como al incremento de la degradación. Si bien se ha encontrado que la putrescina inhibe la actividad de la ODC aunque en un alcance menor que espermidina y espermina, ésta estimula la actividad de la SAMDC. Un aumento en la formación de putrescina aumenta la formación de SAM descarboxilada y por lo tanto acelera la conversión posterior de putrescina a espermidina y espermina por las aminopropil transferasas (32, 33, 55, 78).

REGULACION DE LA ODC

La ODC está también sujeta a la regulación en niveles postraduccionales por un mínimo de dos mecanismos.

Primero. La ODC puede ser fosforilada e inactivada in vitro a través de un mecanismo de retroalimentación por la

caseinquinasa II dependiente de poliaminas; sin embargo, el significado fisiológico de esta reacción no está claro (66).

Segundo, hay evidencia de un inhibidor macromolecular llamado antienzima. Esta proteína rápidamente aumenta en concentración cuando las células están expuestas a poliaminas exógenas. Dicha proteína se enlaza firmemente a la ODC, la cual de este modo se inactiva. La importancia de este mecanismo regulador se ha cuestionado (9, 66).

En la inhibición farmacológica de la biosíntesis de poliaminas se activa cierto número de mecanismos complementarios. Por ejemplo, cuando se inhibe la ODC la SAM descarboxilada junto con el valor disminuido de la degradación de espermina contribuye a que el decremento en el contenido de espermina sea mínimo. Inversamente cuando se inhibe SAMDC, los contenidos disminuidos de espermidina y espermina conducen a un incremento elevado en la actividad de la ODC (32, 33, 78).

INHIBICION DE LAS ENZIMAS QUE BIOSINTETIZAN POLIAMINAS

Como se ha descrito en las células de los mamíferos, la biosíntesis de poliaminas involucra la acción secuencial de 2 descarboxilasas y 2 transferasas. Muchos de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas, que han sido desarrollados para bloquear la acumulación de poliaminas "in vivo", son dirigidos hacia las descarboxilasas (Tabla 10). La alfa-diflurometilornitina (DFMO) es uno de los inhibidores de la ODC más eficientes. El desarrollo preferencial de inhibidores de descarboxilasas puede explicarse por dos razones:

Primera: Se cree que la velocidad de descarboxilación de la ornitina es limitante en la regulación de los pasos biosintéticos de las poliaminas. Aunque, en algunos casos, la síntesis de ornitina podría ser el factor limitante.

Segunda: Los mecanismos catalíticos de las transferasas (espermidina sintasa y espermina sintasa) no han sido aclarados en su totalidad.

TABLA X
INHIBIDORES DE LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS

ENZIMA	INHIBIDOR	MECANISMO DE ACCION
Omitina Descarboxilasa (ODC)	<u>Análogos del sustrato:</u> A. DL- α -hidracina-ornitina B. DL- α -metil-omitina C. DL- α -hidracina-etilornitina D. DL- α -difluoro-metilornitina <u>Análogos del producto:</u> E. Trans-1,4-diamino-2-buteno F. 1,4-diamino-butanona G. 5-hexano-1,4-diamina H. Homólogos de diaminas con 3-12 átomos de Carbono. I. 1,3-diamino-2-propanol	Reversible y competitivo Reversible y competitivo Reversible y competitivo Reversible Reversible y competitivo Reversible y competitivo Irreversible Indirecto (p.e. inducción de ODC antitermita, proteína inhibidora de ODC) Indirecto
S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC)	A. Metilglicoxal-bis (guanilhidrazona) (MGBG) B. 1,1'-(metiletano- -diciano)dicinitilo bis-(3-omnoguandina) (MBAG) C. S-adenosil-DL-2-metilmetonina	Reversible y competitivo (con respecto al sustrato) Reversible inicialmente y competitivo con respecto al sustrato. Después irreversible Reversible y competitivo con respecto al sustrato
Esperridina sintasa	A- γ , ω -diaminas con 3-12 carbonos. El 1,5-diamino-pentano es el más activo	Reversible y competitivo con respecto a uno de los sustratos (putrescina)
Esperridina sintasa	A- γ , ω -diaminas con 3-12 carbonos. El 1,5-diamino-pentano es el más activo	Reversible y competitivo con respecto a uno de los sustratos (espermidina)

INTERACCIONES DE LAS POLIAMINAS CON LOS ACIDOS NUCLEICOS

Bajo condiciones fisiológicas de compatibilidad iónica, las poliaminas están cargadas positivamente; por lo tanto el blanco de su acción son los grupos fosfato cargados negativamente sobre las macromoléculas biológicas, incluyendo DNA y RNA. Las poliaminas estabilizan el entrelazado doble del DNA por incremento de la temperatura de transición de la hélice enrollada (T_f o temperatura de fusión) y son capaces de condensar el DNA en estructuras compactas.

Está claro que las poliaminas se unen y estabilizan al DNA y RNA, y a las proteínas así como a los receptores de estrógeno. Existe una interacción electrostática entre las poliaminas y las regiones cargadas negativamente de las macromoléculas, siendo éste un modo posible de su acción. Las interacciones electrostáticas no pueden explicar adecuadamente todas las interacciones de DNA-poliaminas. Una serie de homólogos de espermidina y espermina se ha evaluado con relación a su habilidad de convertir la hebra derecha del DNA B a la hebra izquierda del DNA Z, por lo que es evidente que la estructura química de las poliaminas influye significativamente en su habilidad para provocar alteraciones conformacionales de DNA (75).

Las poliaminas son excelentes reguladores de las estructuras secundarias y terciarias en los ácidos nucleicos. No solamente porque promueven las transiciones B/Z y B/A y estabilizan las triples hélices sino porque también estabilizan o crean uniones en los ácidos nucleicos.

Estos cambios conformacionales pueden tener efectos generales y específicos en las funciones de los ácidos nucleicos afectando a procesos biológicos como condensación de cromatina, fases del nucleosoma, regulación transcripcional y recombinación del DNA.

Además pueden afectar la citotoxicidad de los agentes dirigidos al DNA como las antraciclinas o los agentes alquilantes.

Las poliaminas también provocan una alteración dramática en la conformación de ciertos polinucleótidos. A pesar de estas observaciones, el mecanismo exacto por el cual las poliaminas apoyan el crecimiento celular permanece incierto. No está claro si la carga, la conformación o la longitud de la cadena determina la función biológica de una poliamina (75).

CITOTOXICIDAD DE LAS POLIAMINAS

Las poliaminas pueden ser citotóxicas en concentraciones inadecuadas.

Se ha reconocido la influencia tóxica de la espermina en microbios desde hace muchos años. Al menos uno de estos mecanismos de toxicidad parece claro; la exposición de E. coli a altas concentraciones inhibe la síntesis de poliaminas.

En el caso de células animales, los estudios de toxicidad de poliaminas son confundidos por la presencia de poliamino oxidasa en el suero bovino presente en el medio de cultivo.

Una forma extremadamente importante de prevenir la sobreproducción de poliaminas es la regulación negativa de la ODC por poliaminas, utilizando lo que parece ser un complejo patrón de mecanismos postraduccionales (60).

Se ha observado citotoxicidad en los cultivos de las células DH23A, células del hepatoma de rata resistentes a la DFMO, debido a la sobreacumulación de putrescina, aunque el mecanismo no está claro. Esta observación apoya la hipótesis de que la baja regulación de la ODC puede ser necesaria para prevenir la acumulación de las concentraciones citotóxicas de las poliaminas (94).

Sin tomar en cuenta los detalles de los mecanismos involucrados, está claro que las células eucariotes tienen

múltiples medios de prevenir la acumulación intracelular de niveles de poliaminas que pueden ser dañinos. Esto sugiere que en células animales, así como en bacterias deben evitar las concentraciones inapropiadas de poliaminas (60).

CAPITULO 4
INHIBICION FARMACOLOGICA
DE LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS

Los intentos por elucidar el papel fisiológico de las poliaminas han sido impedidos por varios problemas:

Primero, la adición de espermidina o espermina puede ocasionar que éstas interactúen de manera inespecífica con los fosfolípidos de la membrana plasmática ejerciendo una acción citotóxica, ya que las amino oxidasas presentes en el suero convierten a las poliaminas en aldehídos que resultan tóxicos (74).

Segundo, las poliaminas de las células beta están compartimentalizadas, aparentemente la mayor concentración se localiza en los gránulos secretores de insulina, la distribución subcelular de poliaminas puede, sin embargo, ser alterada después de la adición exógena de poliaminas (35).

Por lo tanto el significado funcional de las poliaminas no se puede estudiar fácilmente por la adición de estas moléculas a las células. Este importante aspecto puede ser solucionado por disminución de las cantidades intracelulares de poliaminas. Puesto que las enzimas reguladoras de la vía biosintética de las poliaminas, ODC y SAMDC, tienen valores de recambio muy rápidos, estas enzimas son blancos atractivos para los inhibidores. Desde luego los inhibidores de la descarboxilasa han demostrado ser herramientas útiles para la disminución de los niveles de poliaminas.

La D, L - alfa-difluorometil ornitina (DFMO) es un inhibidor específico, potente e irreversible de la actividad enzimática de la ODC, su constante de disociación aparente (K_i) es de $39\mu\text{M}$. La DFMO se absorbe por difusión pasiva y sirve como sustrato para la ODC (78). Por descarboxilación esta molécula pierde un átomo de fluor, produciendo un intermediario altamente reactivo que alquila un residuo nucleofílico en el sitio activo y con eso inactiva permanentemente a la enzima (Figura 13). La especificidad de la DFMO para la inactivación de la ODC puede verificarse fácilmente por la adición de putrescina, el producto de la reacción catalizada por ODC, la cual revierte el efecto producido por el inhibidor (59).

A pesar del empleo extenso de DFMO como inhibidor de la ODC, la estructura del complejo ODC-DFMO no ha sido aún bien determinada, por otra parte, los últimos pasos en el mecanismo de inactivación propuesto por Metcalf et. al. (59) aún no han sido probados (69).

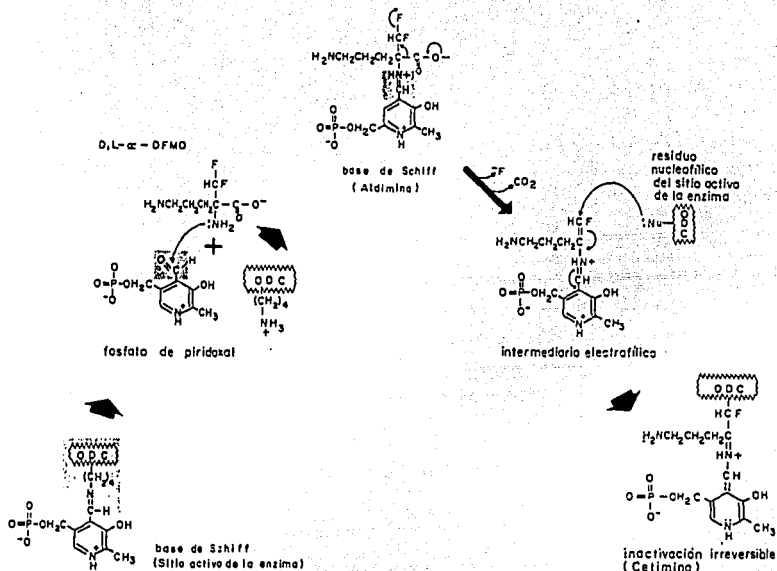


Figura 13. Mecanismo de inactivación irreversible de la ornitina descarboxilasa por D, L - α -difluorometil ornitina.

D, L - ALFA-DIFLUOROMETIL ORNITINA

La DFMO ha sido empleada extensamente en los estudios de la función fisiológica de las poliaminas y tiene un potencial considerable de uso farmacológico contra los protozoos parásitos y otros microorganismos y como agente antineoplásico. La DFMO es virtualmente no tóxica en ratones y ratas normales en dosis suficientes para una inhibición tisular "in vivo" de la ODC.

"In vivo". La DFMO suprime el incremento de la actividad uterina de la ODC asociado con la embriogénesis temprana y detiene el desarrollo embrionario (18, 57, 58).

Estas observaciones sugieren que los incrementos en la actividad de la ODC y en la síntesis de poliaminas pueden desempeñar papeles esenciales en los procesos de crecimiento en las células de los mamíferos.

"In vitro". La DFMO ha demostrado suprimir el incremento temprano en la actividad de la ODC el cual acompaña el inicio de la proliferación de varios tipos celulares. Esta inhibición retarda el crecimiento de muchas células en cultivo, incluyendo las células del hepatoma de ratas, células del sarcoma EMT6 de ratón (17, 49), células L1210 de leucemia en ratón, células de adenocarcinoma pancreático en hamster (52), células tumorales de rata 9L, mieloma murino (50), células del adenoma prostático humano (48, 72) y células del carcinoma de pulmón humano (47, 66).

APLICACIONES DE D, L - ALFA-DIFLUOROMETIL ORNITINA

En la búsqueda de nuevos tratamientos contra las infecciones por protozoarios, se ha sugerido la interrupción de la biosíntesis de las poliaminas (putrescina, espermidina,

espermina), debido a que la evidencia señala a estas moléculas en un papel importante en la replicación de todos los tipos de células (28). La disponibilidad de la DFMO, un inhibidor irreversible de la ODC, el primer paso en la biosíntesis de poliaminas, ha provisto de una nueva herramienta para los estudios del metabolismo de las poliaminas y el papel de éstas en el crecimiento y función celular (20, 101).

La DFMO retarda la proliferación de células, especialmente aquellas con una alta velocidad de multiplicación como las células tumorales o los parásitos tripanosomas, coccidia y plasmodia (20).

El efecto clínico más dramático de la DFMO es el obtenido contra el protozoario Trypanosoma brucei gambiense, el causante de la enfermedad africana del sueño. De hecho, el tratamiento con DFMO ha curado a más del 95% de los pacientes tratados en la última fase de la enfermedad, la cual involucra al sistema nervioso central y no responde a la terapia convencional. Otro protozoario sensible al tratamiento con DFMO es el Pneumocystis carinii, un agente infeccioso oportunista en pacientes con SIDA (34).

Por sus acciones antineoplásicas y antiprotozoarias, la DFMO ha sido empleada como un agente terapéutico "in vivo" en las infecciones de protozoarios como Trypanosoma brucei (4, 14, 28, 53, 54, 66, 76), T. b. rhodesiense y T. b. gambiense (14, 17, 28) en ratones y en coccidiosis en pollos (17, 28, 53, 54); la DFMO también inhibe la infección exocitocítica de Plasmodium berghei con esporozoitos en los ratones infectados, así como la esporogonia en el insecto vector cuando se administra a los mosquitos (20, 54, 76, 101).

El efecto limitado de DFMO en el tratamiento de otras enfermedades infecciosas y varias formas de cáncer, puede deberse a una variedad de mecanismos de regulación que sirven para mantener el contenido óptimo de poliaminas en la célula. Un mayor entendimiento de estos mecanismos podría contribuir al diseño racional de nuevos y potentes fármacos para el tratamiento de enfermedades parasitarias y desórdenes proliferativos que afectan al hombre (93).

La inhibición de la proliferación celular por medio de inhibidores específicos de la síntesis de poliaminas, puede ser revertida al añadir cualquiera de las poliaminas principales (putrescina, espermidina y espermina), aún en bajas concentraciones.

Las poliaminas han demostrado ser esenciales en la replicación de diferentes virus bacterianos pero se conoce poco de los requerimientos similares en la replicación de virus de animales.

Aunque se ha demostrado un efecto antiviral de DFMO contra el virus vaccinia y el citomegalovirus humano (CMV) en células diploides humanas (MRC-5) con valores de ED50 de cerca de 5mM en cada caso, la replicación del virus de herpes simple tipo 2 (HVS-2) no es afectada por DFMO.

Los efectos antivirales de la DFMO pueden relacionarse al incremento o expresión continua de la actividad de la ODC en células infectadas con vaccinia o CMV. En contraste, el HVS-2 no estimula la actividad de la enzima y entre otras infecciones de HVS, la síntesis de poliaminas se inhibe (95).

Los homólogos de putrescina (C2, C3, C4, C5 Y C6) presentan un efecto diferencial en la prevención de la inhibición mediada por DFMO (0.1, 0.25, 0.50, 1.0mM) en el crecimiento celular en linfocitos normales y líneas celulares cancerosas. Solamente los homólogos de putrescina que contienen una cadena corta de metileno son efectivos en la prevención de la acción inhibidora del crecimiento por parte de DFMO sobre la respuesta inmune. En contraste, solamente el homólogo de cadena más larga 1-5 diaminopentano vence el efecto de DFMO sobre el crecimiento celular tumoral. Esta observación puede tener relevancia clínica puesto que la administración de homólogos de cadena corta puede permitir a la DFMO controlar efectivamente el crecimiento de células tumorales, dejando la respuesta inmune normal intacta. Empleando esta estrategia terapéutica se puede limitar la inmunosupresión, y la incidencia a la infección oportunistas (75).

También existen evidencias experimentales que sugieren que las poliaminas están íntimamente relacionadas con la regulación de hipertrofia e hiperplasia celulares (26, 96).

CINETICA DE D, L - ALFA-DIFLUOROMETIL ORNITINA

La farmacocinética de la DFMO se ha investigado en ratones BALB/c después de una inyección intraperitoneal (i.p.) y después de la administración oral del compuesto marcado (DL-alfa-difluorometil-(5-14C)ornitina).

Las concentraciones de DFMO en suero y tejido de ratón BALB/C se determinaron a varios tiempos después de una sola inyección i.p. de DFMO marcada en una dosis de 1 000mg/kg de peso. Aparecen grandes cantidades de radioactividad en el suero y en varios tejidos a los 15 minutos. La concentración de DFMO alcanzada en el suero de ratón a los 15 minutos después de una sola inyección es de aproximadamente 8.5mM, esta concentración decrece rápidamente. La aparente vida media inicial ($t_{1/2\alpha}$) de DFMO en el suero se ha calculado de 14 minutos, mientras que las vidas medias iniciales en músculo, riñón e hígado son 31, 35 y 62 minutos, respectivamente. La vida media de eliminación ($t_{1/2\beta}$) es de aproximadamente de 2.1h. Se observan cinéticas similares después de una administración i. p. de DFMO en dosis de 200mg/kg o 2 000mg/kg. Las concentraciones de DFMO medidas en suero y tejidos (riñón, hígado, bazo y músculo) 2 horas después de una inyección i. p. presentan una relación lineal con la dosis administrada encima del rango estudiado (arriba de 2 000mg/kg peso).

Sin embargo, se asume que la DFMO no es metabolizada en una cantidad considerable en los ratones en las condiciones establecidas y que las concentraciones de DFMO se reflejan correctamente en los niveles determinados de radioactividad.

Tales resultados demuestran que la vida media de la DFMO después de la administración i.p. en los ratones es muy corta. Aunque los niveles en el suero y los tejidos pueden ser incrementados elevando la dosis de DFMO. La corta vida media no favorece la aplicación de inyecciones i.p. en muchos tipos de estudios terapéuticos en ratones. En particular, en ratones desnudos no es factible dar inyecciones repetidas (varias veces por día) por un período largo (71).

De acuerdo con los estudios "in vitro" e "in vivo" la

DFMO se absorbe bien por el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad aproximada de 50 - 60% en el hombre (27).

La cinética de DFMO se ha estudiado en hombres sanos, a quienes se les ha administrado dosis únicas de 5 y 10mg/kg de peso por vía intravenosa y dosis orales de 10 y 20mg/kg. Las concentraciones plasmáticas han sido monitoreadas durante las 24 horas después de cada dosis.

Las concentraciones plasmáticas elevadas se alcanzan dentro de las 6 horas después de las dosis orales (Figura 14). La concentración plasmática máxima se alcanza a las 4 horas después de la administración del compuesto. El decaimiento de las concentraciones plasmáticas obedece a una cinética de primer orden con una vida media ($t_{1/2}$) para las 4 dosis estudiadas de 199 ± 6 minutos (\pm DS). La eliminación total del cuerpo para las 4 dosis es de 1.20 ± 0.06 ml/min.Kg. La eliminación renal es de 0.99 ± 0.03 ml/min.Kg, lo cual responde al 83% de eliminación. La DFMO es principalmente eliminada por los riñones, >86% de las dosis orales se eliminan del cuerpo por filtración renal. En el caso de las dosis por vía intravenosa, el 81% del compuesto se elimina por los riñones. El volumen aparente de distribución (aVD) es de 0.337 ± 0.031 l/kg, lo que corresponde a 24l por 70 kg de peso corporal, lo que excede el volumen extracelular de 12l pero es menos que el total del volumen de agua del cuerpo (aproximadamente 42l)..

La biodisponibilidad de una dosis de 10 mg/kg se estima de 58%. Del estudio de la cinética de DFMO se establece que este compuesto obedece a un modelo dosis lineal.

Los efectos de la DFMO están siendo estudiados en varias enfermedades humanas que pueden responder a la inhibición de la actividad de la ODC y la depresión de la síntesis de poliaminas. En una variedad de modelos animales la DFMO efectivamente inhibe la actividad de la ODC en concentraciones por arriba de 50 nmol/ml. La información cinética permite el diseño de horarios apropiados de la dosis.

Una concentración plasmática máxima constante de 100 nmol/ml puede obtenerse dando dosis repetidas de 20mg/kg de DFMO cada 6 horas (27).

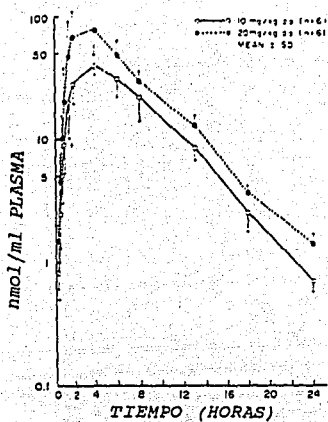


Figura 14. Concentraciones plasmáticas de DFMO. Concentraciones plasmáticas de DFMO después de dosis orales de 10 mg/kg (o - o) y de 20 mg/kg (● - ●) en 6 individuos.

PROBLEMAS EN LOS ESTUDIOS CON D, L - ALFA-DIFLUOROMETIL ORNITINA

En estudios realizados en animales la DFMO se ha administrado comúnmente en el agua para beber como una solución al 2% o 3% (p/v). Sin embargo, debido a que la mayor parte del consumo del agua por parte de las ratas y ratones ocurre durante la noche, la cantidad de la solución de DFMO consumida puede variar considerablemente entre los animales obteniéndose así concentraciones muy irregulares del inhibidor en el suero. Se ha observado que la vida media de eliminación de la DFMO en el suero llega ser de 1.4 horas (24, 45). Por lo tanto, el tratamiento con DFMO en ratas podría resultar poco eficaz durante el día, cuando el consumo del agua es poco. Por otra parte altas dosis de DFMO administradas a las ratas vía oral ocasionan efectos gastrointestinales secundarios como diarrea y pérdida de peso corporal. Por lo que se recomienda una infusión continúa intravenosa de DFMO para poder proporcionar una inhibición eficiente y continua de la ODC (24).

La toxicidad relativamente baja de la DFMO indica que este inhibidor puede ser empleado en combinación con otros fármacos para mantener la terapia entre ciclos de quimioterapia intensiva (51). Sin embargo un problema importante en el desarrollo de regímenes de quimioterapia de combinación con DFMO ha sido la falta de monitoreo de la inhibición de la actividad de ODC "in vivo" (65). En la fase I experimental, Warrell et. al. (98) han reportado una actividad sinérgica de la combinación de DFMO y metilglixalbis(guanilhidrazona) (MGBG) en pacientes con linfoma y tumores gastrointestinales y concluyeron que el monitoreo del metabolismo de poliaminas es necesario para determinar la dosis óptima de DFMO capaz de inhibir la biosíntesis de poliaminas en el tumor sin producir toxicidad al huésped.

Las investigaciones han revelado que los daños mayores de la administración oral de DFMO son trombocitopenia, efectos gastrointestinales secundarios y atenuación de la agudeza auditiva. La trombocitopenia es un factor tóxico dosis limitante durante la administración intravenosa continua de DFMO (1, 65).

La administración de DFMO en infusión constante se basa en el valor de recambio de la ODC (10-30 minutos). De modo que para inhibir eficazmente la biosíntesis de poliaminas en tumores puede requerirse de la disponibilidad continua de este inhibidor. En el estudio realizado por Ota et al. (65) los resultados muestran que una dosis de DFMO de 500mg/kg de peso/día administrada por infusión intravenosa continua en ratas proporciona una actividad antitumoral significativa sin supresión de las cifras plaquetarias o alteración de la morfología del epitelio intestinal.

Se ha demostrado que la infusión intravenosa de DFMO durante 12 días provoca una disminución en la velocidad del crecimiento de tumores experimentales MCA (sarcoma inducido por metilclorantreno), lo cual se logra con una dosis de 500mg/kg de peso/día sin cambios significativos en la cuenta plaquetaria. Puede alcanzarse una toxicidad tumoral mayor utilizando dosis más altas de DFMO o prolongando el tiempo de infusión. Sin embargo, a dosis de 1 000 - 2 000 mg/kg de peso/día se ha observado una trombocitopenia significativa y tiempos de infusión muy prolongados pueden llevar a la muerte. El crecimiento tumoral lento en presencia de DFMO sugiere que este agente es probablemente poco eficaz si se administra solo pero puede mejorar la respuesta tumoral con agentes quimioterápicos citotóxicos como metilglioxal-bis (guanilhidrazona) (MGBG) y 1,3-bis (2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU) (65).

Los estudios dosis-respuesta han demostrado que poco se gana en términos de inhibición empleando altas dosis (24). Por otra parte el tratamiento a largo plazo con DFMO "in vitro" ha demostrado incrementar la resistencia a dicha sustancia debido a la amplificación del gen de la ODC con la consecuente sobreproducción de la enzima. Se desconoce si dicho mecanismo es activo también "in vivo" (2).

Grossie et al. (22) encontraron que, para disminuir significativamente la actividad de la ODC hepática en ratas con un tratamiento de DFMO a largo plazo, son necesarias dosis de 1000mg/kg/día o dosis mayores. Por consiguiente, dosis más grandes que las empleadas por Haarstad et al. (600mg/kg/día) (24) y Ota et al. (500mg/kg/día) (65) pueden ser necesarias para obtener una inhibición prolongada de la ODC.

DFMO Y PANCREAS

Se han realizado estudios de inhibición de poliaminas utilizando DFMO y se han observado los efectos de dicha inhibición sobre la secreción y crecimiento pancreáticos en rata. Una observación importante de tales investigaciones es que el efecto inhibitor de DFMO sobre la ODC y el crecimiento pancreático es transitorio, ya que dura aproximadamente 24 horas a pesar de un tratamiento continuo durante 48 horas (24). Esto está de acuerdo con los resultados de Danzin et al. (12) quienes encontraron que las inyecciones repetidas de DFMO reducen de forma significativa la actividad prostática de la ODC en rata durante el período de tiempo comprendido de las 4 a las 12 horas que después de las 36 a las 48 horas de tratamiento.

Las investigaciones han sugerido que el metabolismo de las poliaminas puede jugar un papel importante en el crecimiento pancreático inducido por hormonas. La DFMO no solamente inhibe el incremento de la ODC y de las poliaminas en el páncreas de rata "in vivo", sino que también disminuye de manera significativa y reduce parcialmente el incremento en los parámetros tróficos (peso del páncreas, contenido en el páncreas de DNA, proteínas, amilasa, DNA polimerasa y timidina quinasa).

Muchos estudios indican que las poliaminas están involucradas en la mediación de los efectos estimulantes de las hormonas gastrointestinales colecistoquinina (CCK) y secretina sobre el crecimiento pancreático en rata. La DFMO inhibe de manera significativa el efecto de la secretina sobre la DNA polimerasa a las 48 horas de tratamiento.

Stace et al. (86) no encontraron que la DFMO fuera útil para prevenir en ratas la hiperplasia pancreática inducida por división pancreático-biliar (PBD), un modelo para inducir el crecimiento pancreático mediante la liberación de CCK endógena.

Previamente se ha demostrado que el incremento en la síntesis de poliaminas es un determinante temprano y sensible

del efecto del crecimiento inducido por el péptido parecido a la colecistoquinina (CCK-LP) sobre el páncreas de rata. La DFMO ejerce una inhibición prolongada de la actividad de la ODC sin afectar el volumen y el contenido proteínico en las respuestas secretorias a CCK-LP en la glándula después de 6 horas de tratamiento.

Estas observaciones concuerdan con los resultados previos que indican que un incremento en la actividad de la ODC no es un requisito para la respuesta secretoria inicial y para la síntesis de proteínas inducidas por CCK-LP en el páncreas.

De acuerdo a otros estudios relacionados con los parámetros tróficos del páncreas, en intestino delgado o hígado no hay cambios en las concentraciones de espermina en los animales experimentales o control, lo que indica que la espermina no influye en estos parámetros. Además, no se ha encontrado una influencia considerable de la DFMO sobre la concentración de amilasa pancreática, lo que sugiere que la ODC y las poliaminas no efectan o influyen la secreción de esta enzima pancreática mediada por colecistoquinina (CCK) (46).

En resumen, la inhibición de la ODC por DFMO no afecta las respuestas de secreción inicial pancreática y de síntesis de proteínas inducida por CCK pero inhibe temporalmente la respuesta al crecimiento tanto de CCK como de secretina. Las poliaminas ejercen una función crucial en la iniciación de la respuesta al crecimiento inducido por estimulación hormonal (24).

CAPITULO 5
POLIAMINAS Y CELULA BETA

EL PAPEL DE LAS POLIAMINAS EN LA PRODUCCION Y SECRECION DE INSULINA

Los métodos citoquímicos usuales no han sido útiles para demostrar la presencia de las poliaminas. Esto hace que se dificulten las interpretaciones de su papel fisiológico y celular.

Se han desarrollado dos métodos citoquímicos fluorescentes: formaldehído-fluorescamina y orto-ftalaldehído, que aunque difieren en principios químicos, prueban selectivamente las dos poliaminas principales: espermidina y espermina.

Utilizando estos métodos se ha encontrado que en el páncreas la mayor parte de las poliaminas está restringida al citoplasma de las células productoras de insulina (donde existen en los gránulos secretores) y que su síntesis es estimulada por glucosa (35).

En la rata y el ratón, la espermina y la espermidina se encuentran en altas concentraciones en los islotes pancreáticos. Los islotes de ratón contienen 0.3-0.5mmol/l de putrescina, 3.9-5.9 mmol/l de espermidina y 1.2-1.9 mmol/l de espermina.

A diferencia de las otras células de mamíferos, la síntesis de proteínas en las células de los islotes es estimulada por glucosa en concentraciones fisiológicas. Se sabe que las poliaminas son importantes para la biosíntesis de proteínas y para la división celular. Además se ha especulado que las poliaminas pueden estimular la liberación de insulina, ya sea que actúen como sustratos para las transglutaminasas (enzimas que se sabe están presentes en las células productoras de insulina y que se ha postulado que son importantes para la liberación de la hormona) o que funcionen como segundos mensajeros. Contrario a esto Thams et al. (90) sugirieron que las poliaminas ejercen una acción inhibitoria sobre la secreción de insulina, puesto que no encontraron ningún incremento en la concentración de poliaminas cuando expusieron islotes a alta concentración de glucosa en periodos de 5 a 60 minutos (8, 90). Sin embargo, los

islotes mantenidos en concentraciones altas de glucosa a largo plazo presentan un incremento tanto en la síntesis como en las concentraciones de poliaminas (35, 78, 100).

Los inhibidores de la biosíntesis de las poliaminas se han empleado en diferentes combinaciones para poder diferenciar parcialmente entre los efectos de las tres poliaminas e investigar el papel de estas aminas en la regulación del contenido del mRNA de insulina, biosíntesis de insulina y proteínas, y la liberación de insulina estimulada por glucosa (100).

Se ha encontrado que la combinación de DFMO (5mM) + MAP (putrescina metil acetilada, 200µM) no afecta el contenido de insulina ni la biosíntesis de proinsulina en los islotes cultivados durante dos días en presencia de estos inhibidores. Los islotes cultivados con DFMO (5mM) + MAP (200µM) + EGBG (etilglicoxal bis(guanilhidrazona), 100µM) presentan una liberación menor de insulina que los islotes control a una concentración de glucosa 16.7mM.

La liberación de insulina del islote no es afectada por DFMO + MAP. La DFMO agota los contenidos de putrescina y espermidina de las células beta, sin embargo, no afecta el contenido de espermina; un resultado no sorprendente puesto que la proliferación lenta de las células permite que la concentración de espermina no se agote cuando se hace uso de este inhibidor.

Cuando se emplea sólo EGBG se observa una disminución del contenido de espermina así como un incremento marcado de la concentración de putrescina, lo cual sugiere que la espermina ejerce una acción inhibidora sobre la actividad de la ODC.

La combinación DFMO + MAP no ejerce ningún efecto sobre el metabolismo del mRNA de insulina. De este modo parece ser que la putrescina y la espermidina están reguladas en algún nivel transduccional que no controla específicamente la biosíntesis de insulina.

A una concentración elevada de glucosa el decremento

de espermina, en adición a los de putrescina y espermidina, ocasiona un daño marcado en la biosíntesis de proinsulina, disminuyen tanto el contenido de insulina como el del mRNA de ésta y se reduce la liberación de insulina.

La glucosa parcialmente contrarresta el decremento del contenido de espermina en el islote "in vitro" e incrementa el contenido de espermina durante un período de cultivo de 2 días (100).

LAS POLIAMINAS COMO MENSAJEROS EN LA LIBERACION DE INSULINA

Las observaciones acerca del alto contenido de poliaminas en las células beta y su asociación con los gránulos secretorios sugieren que estas aminas pueden desempeñar alguna función como mensajeros en la liberación de insulina estimulada por glucosa (35). Sin embargo los islotes agotados en sus contenidos de putrescina y espermidina presentan una excelente liberación de insulina en respuesta a la glucosa, lo cual sugiere que estas poliaminas (putrescina y espermidina) no tienen importancia en este proceso. La observación de que los islotes agotados de espermina liberan menos insulina que los islotes control durante su incubación en una alta concentración de glucosa (100), apoya la propuesta de que las poliaminas pueden actuar como sustratos para las transglutaminasas (35, 100). Sin embargo, este efecto permisivo o estimulante de la espermina en la liberación de insulina por estímulo de la glucosa parece operar a largo plazo más que a corto plazo (90).

No se puede excluir que las células de los islotes sintetizan otras sustancias aparte de las poliaminas, las cuales están estrechamente relacionadas con éstas y a las que pueden sustituir en este contexto por sus acciones (100).

El resultado de una disminución del mRNA de insulina en los islotes tratados con EGBG explica parcialmente el decremento en la biosíntesis y contenido de insulina. Es posible que todos los resultados reflejen un requerimiento de espermina para la transcripción del gen de insulina.

El incremento del mRNA de insulina inducido por glucosa es paralelo al incremento de los contenidos y valores de la biosíntesis de poliaminas, una atenuación del aumento de estas moléculas previene el aumento en el mRNA de insulina. Esto se debe a que las poliaminas incrementan la estabilidad del mRNA.

Las poliaminas modulan la actividad de las RNA polimerasas "in vitro". Las poliaminas influyen en la estabilidad del RNA por enlace directo a éste o por interacción con las enzimas que degradan las moléculas de este

ácido nucleico. Sin embargo, los resultados de los estudios "in vivo" han estado lejos de concluir una relación directa entre el metabolismo de las poliaminas y lo que al RNA concierne. En un estudio previo se ha observado que la inhibición de la biosíntesis de poliaminas causa disminución en los contenidos de mRNA de insulina en los islotes pancreáticos de ratón "in vitro". Debido a que la glucosa incrementa la biosíntesis y los contenidos celulares de poliaminas se ha estudiado el papel de estas moléculas en la expresión del gen de insulina estimulada por glucosa.

Se han empleado los inhibidores DFMO y EGBG para atenuar el incremento inducido por glucosa en la biosíntesis de poliaminas. Como EGBG no es un inhibidor completamente específico, no puede excluirse que algunos de sus efectos puedan deberse a otras acciones junto a la inhibición de S-adenosilmetionina descarboxilasa. Sin embargo, la viabilidad de las células de los islotes tratadas con EGBG no parece ser dañada, según las determinaciones de las proporciones de consumo de oxígeno y ATP, contenido de proteínas y DNA.

Los islotes cultivados a una concentración baja de glucosa (3.3mM) antes de la adición de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas presentan bajos contenidos del mRNA de insulina y de poliaminas, y los mecanismos por los cuales las concentraciones altas de glucosa (16.7mM) estimulan la función de la célula beta pueden ser caracterizados fácilmente. Los resultados muestran que el incremento de mRNA de insulina inducido por glucosa es paralelo al incremento del contenido de espermidina y espermina y que la DFMO atenúa el aumento de espermidina. Después de la adición de los inhibidores de la ODC, las células que proliferan lentamente aumentan dramáticamente la síntesis y la vida media de la espermina.

Este mecanismo compensatorio es, sin embargo, contrarrestado por la combinación EGBG (100µM) + DFMO (5mM), que previene el aumento de espermina inducido por glucosa. Podría, sin embargo, ser indicativo de que la combinación DFMO + EGBG no agota el contenido de espermina después de que los islotes se cultivan con una baja concentración de glucosa.

La espermina puede ejercer efectos específicos en la célula beta pancreática, puesto que el contenido de esta

poliamina es considerablemente más alto que en la mayoría de los otros tipos de células (99).

Desafortunadamente, el contenido nuclear de poliaminas en las células del islote es difícil de determinar ya que se requieren grandes cantidades de tejido. Lo anterior ocasiona que los niveles de poliaminas totales no sean representativos para el núcleo, el cual es el sitio de la transcripción del mRNA de insulina. Sin embargo, evaluando en el islote la biosíntesis de poliaminas asociadas al núcleo se ha encontrado que la glucosa estimula la acumulación de poliaminas sintetizadas en este organelo.

La proporción de la síntesis de poliaminas asociada con el núcleo parece ser menos afectada que la proporción de la síntesis de las poliaminas totales en los islotes tratados con DFMO + EGBG, esto indica que las poliaminas son preferentemente transferidas a este organelo. Si este es el caso, los inhibidores de la síntesis de poliaminas usados hasta ahora pueden no tener la atenuación adecuada al incremento inducido por glucosa de las poliaminas nucleares. Por tanto, es difícil dirigir el papel de las poliaminas en los procesos que ocurren en el núcleo, así como la transcripción del gen de insulina.

El aumento inducido por la glucosa en la síntesis de mRNA de insulina y RNA total permanece inalterado en los islotes tratados con DFMO, lo que sugiere que el efecto de la glucosa no es mediado por el incremento en el contenido de espermidina. Sin embargo, el resultado de que los niveles de mRNA de insulina no se incrementan cuando se previene el aumento de poliaminas que implica a la espermina sola, o a la combinación de espermina y espermidina, sugiere que la espermina puede actuar en parte como un posible mediador del efecto de la glucosa. A diferencia de que EGBG + DFMO ejercen un efecto general y no específico sobre el metabolismo de RNA del islote, los valores de la síntesis o recambio de RNA no son afectados por los inhibidores.

En resumen, la glucosa regula "in vitro" los niveles de espermidina y espermina en los islotes. La putrescina y la espermidina parecen ser necesarias para la biosíntesis de insulina y proteínas, mientras que por otro lado el decremento

de la concentración de espermina disminuye el contenido de mRNA de insulina, biosíntesis y contenido de insulina, liberación de insulina sensible a la glucosa y síntesis de DNA en el islote. Estos resultados apoyan la sugerencia de que las poliaminas actúan como factores permisivos o estimulantes en varios sitios diferentes de la producción de insulina "in vitro" (100). Resulta difícil localizar el lugar exacto en el cual la espermina actúa, porque varios pasos en la producción de insulina próximos a la liberación exocitótica de la hormona resultan dañados por EGBG (78).

En conclusión, la espermina parece mediar, al menos en parte, el efecto estimulante de la glucosa sobre la expresión del gen de insulina, posiblemente protegiendo al mRNA contra la degradación. Los resultados, sin embargo, no excluyen la posibilidad de un efecto de la espermina sobre la transcripción de mRNA. Son necesarios estudios adicionales para determinar si la espermina actúa específicamente sobre mRNA de insulina o si otros mensajeros son similarmente afectados.

La secreción de insulina no se incrementa en las células tratadas con los inhibidores de la síntesis de poliaminas (100). Estos resultados están en desacuerdo con lo sugerido por Thams et al. (90) de que las poliaminas inhiben la secreción de insulina. Una posible explicación a esta discrepancia es que tal vez estos investigadores aplicaron altas concentraciones de poliaminas directamente a los islotes aislados, una maniobra que pudo conducir a interacciones inespecíficas de las poliaminas en la membrana. Por otro lado, puesto que EGBG no es un inhibidor completamente específico de SAMDC es importante averiguar si no ejerce alguna citotoxicidad mayor no relacionada con la inhibición de la síntesis de poliaminas en las células de los islotes. Para tal propósito, los resultados muestran que las concentraciones en el islote de DNA, proteínas y ATP así como los valores de oxidación de la glucosa y respiración no disminuyen en los islotes expuestos a EGBG, lo cual prueba que no se presenta toxicidad alguna (78, 83).

Las altas concentraciones de poliaminas en las células beta y su asociación con los gránulos secretores han proporcionado la evidencia adicional de que estas moléculas

tienen un papel significativo en el almacenamiento o secreción de insulina. La alta proporción de espermina a espermidina en los islotes pancreáticos del ratón adulto, en conjunción con los resultados que se refieren a un daño selectivo en la producción de insulina después de la exposición a EGBG (100), sugieren con firmeza que la espermina es la más importante de las poliaminas para mantener la biosíntesis y secreción normal de insulina. En contraste con la alta proporción de espermina a espermidina en los islotes de rata adulta, la espermidina es relativamente la amina más abundante en los islotes fetales. Esta falta relativa de espermina podría explicar parcialmente la liberación tardía de insulina en respuesta a glucosa en las células beta fetales (83).

POLIAMINAS Y PROLIFERACION DE LAS CELULAS BETA

En estudios recientes en los que se han utilizado cultivos de islotes fetales de rata, se ha encontrado que la síntesis de poliaminas es inducida por la estimulación mitogénica de los siguientes factores: glucosa, hormona del crecimiento (GH) y la combinación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) más los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF-I). Esto se manifiesta con el incremento en las concentraciones de estas moléculas después de la estimulación con tales factores. Los inhibidores de la ODC DFMO y MAP neutralizan el aumento inducido en los contenidos de putrescina y espermidina, manteniendo elevado el de espermina. Esto probablemente se debe a la larga vida media y reutilización de esta amina final en la lenta proliferación celular y a la disminución en su degradación. Contribuyendo a esto se encuentra el suministro intracelular de SAM descarboxilada, la cual compensa la disminución de la concentración de putrescina y permite continuar la síntesis de espermina (62, 63, 83, 89).

CONTENIDO NUCLEAR DE POLIAMINAS

Las caracterizaciones realizadas sobre la distribución de las poliaminas en las células beta revelan que el contenido nuclear de poliaminas no es afectado por los inhibidores de la síntesis. Esto sugiere la existencia de un mecanismo para el mantenimiento de los niveles normales de espermidina y espermina en el núcleo, tal mecanismo opera cuando disminuyen los contenidos de las poliaminas citoplásmicas debido a la inhibición farmacológica (83).

Esto puede servir como un indicador por el cual la síntesis de DNA es sostenida a pesar de la reducción citosólica de poliaminas en las células beta, pero también representa una trampa potencial en el uso de DFMO y EGBG como herramientas para el estudio de la replicación de la célula beta. Aunque los resultados indican que del 20 al 30% del contenido total de poliaminas celulares puede estar confinado al núcleo, no puede excluirse que dicho valor sea más alto puesto que las poliaminas libres son susceptibles a difundirse fuera de éste durante el proceso de fraccionamiento. Aún se desconoce si esto también puede explicar el resultado de la falta de estimulación por parte de la glucosa en los contenidos nucleares de poliaminas, lo cual difiere de la observación de que la glucosa aumenta la síntesis de poliaminas asociadas con el núcleo de las células en el islote de ratón adulto (78, 99).

Otra posibilidad que merece ser considerada es que el contenido alterado de poliaminas puede no presentarse bajo condiciones fisiológicas sino tal vez represente un mecanismo de "emergencia" activado por la exposición a DFMO y EGBG. Más específicamente, la señal mitogénica de la glucosa puede transferirse a través del incremento del contenido citosólico de las poliaminas que a su turno activa otros mecanismos que llevan el mensaje al núcleo. Uno de tales mecanismos puede ser el de la caseinoquinasa II dependiente de poliaminas que se localiza tanto en el citosol como en el núcleo y se ha encontrado en las células beta de ratón (83). Esta proteinoquinasa se activa por estimulación mitogénica y recientemente se ha descubierto que fosforila las oncoproteínas nucleares que se cree juegan un papel central en el control de la replicación celular (78).

LAS POLIAMINAS COMO REGULADORES DE LA FOSFORILACION DE LAS PROTEINAS

Se sabe que la fosforilación/desfosforilación de las proteínas es un proceso muy importante en la regulación de la secreción de insulina en los islotes pancreáticos. Por lo que es lógico pensar que la secreción de insulina de los islotes es regulada por los mecanismos de fosforilación (91).

En los islotes de ratón se ha encontrado evidencia para sugerir que la fijación de las poliaminas a los fosfolípidos de las membranas puede prevenir el enlace y la activación de la proteinoquinasa C y que el flujo de Ca^{2+} puede funcionar por desplazamiento de las poliaminas unidas a la membrana (90).

Los resultados muestran una actividad de la proteinoquinasa acrecentada por poliaminas en los islotes de ratón, probablemente correspondiente a la categoría de caseinoquinasa II. De este modo, tanto espermidina como espermina estimulan la fosforilación.

La presencia de cantidades sustanciales de poliaminas, del efecto inhibidor de éstas sobre la proteinoquinasa C, así como las observaciones de la actividad citosólica acrecentada de la caseinoquinasa II por poliaminas en los islotes sugieren que estas moléculas pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la fosforilación de las proteínas en los islotes pancreáticos (91).

Los resultados indican que la glucosa, GH y PDGF + IGF-I son capaces de inducir una respuesta mitogénica significativa en las células beta fetales (62, 63, 78, 83, 89).

Recientemente se han identificado la pancreastatina y el DBI (inhibidor de la fijación del diazepam) como inhibidores de la replicación de la célula beta. La pancreastatina también disminuye el contenido de las

poliaminas en los islotes, un evento que posiblemente contribuye a la acción antiproliferativa de este péptido. Puesto que ambos, pancreastatina y DBI son producidos por las células de los islotes, es posible que puedan funcionar como inhibidores pancreáticos de la replicación de la célula beta "in vivo" (78, 80).

POLIAMINAS Y CELULAS DE INSULINOMA RINm5F

Con el propósito de aclarar el papel de las poliaminas en la replicación y producción de las células secretoras de insulina, se ha investigado el impacto de la disminución parcial de las poliaminas sobre la proliferación, metabolismo, síntesis de insulina y ultraestructura de las células clonadas de insulinoma de rata (RINm5F) (78, 79, 81). Para este propósito las células RINm5F fueron expuestas por 4 días a DFMO. Lo que dió como resultado una disminución dramática en la actividad de la ODC y el contenido de las poliaminas citoplásmicas. La concentración de poliaminas del núcleo no fue alterado por la DFMO.

La adición de pequeñas cantidades de putrescina durante el cultivo eleva el contenido intracelular de esta diamina y suprime la actividad de la ODC. La disminución en el contenido de poliaminas se acompaña de una marcada inhibición de la actividad celular proliferativa. Los valores de la utilización de la glucosa, consumo de oxígeno y actividad del ciclo de las pentosas disminuyen en las células tratadas con DFMO, mientras que el valor de la oxidación de la glucosa, proporción oxidación/utilización, contenido de ATP y proporción ATP/ADP son incrementados. El contenido de mRNA de insulina y la síntesis de proinsulina, insulina y proteínas totales no son alterados por DFMO. En contraste, hay un incremento considerable en el contenido celular de insulina, a pesar del contenido disminuido de las proteínas totales.

El análisis por microscopía electrónica revela una acumulación de los gránulos secretores de insulina en las células tratadas con DFMO. Además, la liberación de insulina a corto plazo es incrementada después de la exposición a DFMO, pero no es interpretada como sensible a la glucosa.

Se concluye que las poliaminas son necesarias para el mantenimiento de la replicación rápida de las células de insulinoma y que las células RINm5F tratadas con DFMO adquieren un aumento en el valor de la oxidación del sustrato y un incremento en el contenido de insulina y ATP.

El contenido inalterado de mRNA de insulina, la síntesis de insulina y el contenido elevado de insulina en las células RINm5F tratadas con DFMO sugiere que la disminución parcial de poliaminas en las células de insulinoma tiene efectos sobre la producción de insulina los cuales son diferentes a los observados después del correspondiente tratamiento en las células de los islotes normales de ratón. En estas últimas células, la deficiencia de poliaminas es asociada con daños en la síntesis de insulina e inhibición en la replicación celular. Sin embargo, aunque elevados, los contenidos celulares de ATP e insulina en las células RINm5F tratadas con DFMO son aún mucho más bajos que en los islotes normales de rata.

El contenido inalterado de mRNA de insulina y la síntesis de insulina en asociación con los contenidos incrementados de ATP en las células tratadas con DFMO es una variante de la situación en las células beta en rata normal, en las cuales el incremento de los contenidos celulares de ATP coinciden con la estimulación de la producción de insulina.

Este resultado puede reflejar la importancia de las poliaminas para la transcripción, estabilización de RNA y traducción. La producción inalterada de insulina puede de esta forma ser el resultado del efecto dual ejercido por la DFMO sobre el contenido de poliaminas y del ATP con las células RINm5F (81).

El contenido de insulina no solamente depende de su síntesis sino también de la degradación y secreción de la hormona. De este modo la liberación fraccional de insulina (la proporción entre la insulina secretada y el contenido de insulina) es disminuido en las células tratadas con DFMO, lo cual puede explicar la vigorización de la cantidad de los gránulos de secreción observada ultraestructuralmente.

Los resultados indican un efecto de la DFMO exclusivamente sobre la secreción de insulina almacenada, ya que la liberación de la hormona recién sintetizada permanece inalterada por el inhibidor. Pudiera ser que la DFMO impusiera un cambio en la distribución de las células del insulinoma normalmente caracterizada por el predominio de una vía

constitutiva secretoria, en apoyo a la secreción regulada encontrada en las células beta nativas (78, 81).

El contenido disminuido de proteínas en las células tratadas con DFMO no puede ser tomado como un reflejo de toxicidad por parte del inhibidor, puesto que los niveles de insulina y ATP son elevados. En vez de eso, es probable que el contenido proteínico se deba a un decremento en el tamaño celular (81).

CONCLUSIONES

El estudio de la función fisiológica de las poliaminas en la célula beta ha contribuido al entendimiento de los mecanismos moleculares relacionados con la deficiencia relativa de insulina en la Diabetes mellitus, lo que se ha observado por la inhibición específica de su síntesis. Por otro lado, son necesarios estudios adicionales para aclarar el papel ejercido por las poliaminas en el crecimiento pancreático inducido por estimulación hormonal.

REFERENCIAS

1. Abeloff, M. D., M. Slavik, G. D. Luk, C. A. Griffen, J. Hermann, O. Blanc, A. Sjoerdsma, and S. B. Baylin. Phase I trial and pharmacokinetic studies of alpha-difluoromethylornithine -an inhibitor of polyamine biosynthesis. J. Clin. Oncol. 2: 124-130, 1984.
2. Alhonen-Hongisto L., A. Kallio, R. Sinervirta, P. Seppänen, K. K. Kontala, O. A. Jänne, and J. Jänne. DFMO induced amplification of ODC genes in Earlich ascites carcinoma cells. Biochem. Biophys. Res Commun. 126: 734-740, 1985.
3. Bacchi C. J. Content, synthesis, and function of polyamines in trypanosomatids: relationship to chemotherapy. J. Protozool. 28: 20-27, 1987.
4. Bacchi C. J., H. C. Nathan, S. H. Hatner, P. P. McCann, and A. Sjoerdsma. Novel combination chemotherapy of experimental trypanosomiasis by using bleomycin and D, L - alpha-difluoromethylornithine; reversal by polyamines. Biochem. Pharmacol. 31: 2833-2836, 1982.
5. Bartolome, J. V., L. Schweitzer, J. A. Slotkin, and J. V. Nadler. Impaired development of cerebellar cortex in rats treated postnatally with alpha-difluoromethylornithine. Neuroscience 15: 203-213, 1985.
6. Bockman, D. E. Anatomy of the pancreas. In: The Pancreas: Biology, Pathology and Disease. 2nd edition. Vay Liang W. Go, et al. (Ed), Raven Press. Ltd., New York, 1993, 1-8.
7. Brunstedt, J., and S. J. Chan. Direct effect of glucose on the preproinsulin mRNA level in isolated pancreatic islets. Biochem. Biophys. Res Commun. 106: 1383-1389, 1982.
8. Bungay, P. J., J. M. Potter, and M. Griffin. A role for polyamines in stimulus-secretion coupling in the pancreatic B-cell. Biosci. Rep. 4: 869-877, 1984.

9. Canellakis, E. S., D. A. Kyriakidis, C. A. Rinehart, Jr., S. C. Huang, C. Panagiotidis, and W.-F. Wong. Regulation of polyamine biosynthesis by antizyme and some recent developments relating the induction of polyamine biosynthesis to cell growth. Biosci. Rep. 5: 189-204, 1985.
10. Cook, D. L., and G. J. Taborsky, Jr. B-cell function and insulin secretion. In: *Diabetes Mellitus: Theory and Practice*. 4th edition. Rifkin, H., and D. Porte, Jr. (Eds), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1990, 89-103.
11. Danzin, C., M. J. Jung, J. Grove, and P. Bey. Effect of alpha-difluoromethylornithine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, on polyamine levels in rat tissues. Life Sci. 24: 519-524, 1978.
12. Danzin, C., M. J. Jung, N. Claverie, J. Grove, A. Sjoerdsma, and J. Koch-Weser. Effects of alpha-difluoromethylornithine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, on testosterone-induced regeneration of prostate and seminal vesicle in castrated rats. Biochem. J. 180: 507-513, 1979.
13. Davis R. H. Management of polyamine pools and the regulation of ornithine decarboxylase. J. Cell. Biochem. 44: 199-205, 1990.
14. Davis, R. H., D. R. Morris, and P. Coffino. Sequestered end products and enzyme regulation: the case of ornithine decarboxylase. Microbiol. Rev. 56: 280-290, 1992.
15. Fajans, s. s. Classification and diagnosis of diabetes. In: *Diabetes Mellitus: Theory and Practice*. 4th edition. Rifkin, H., and D. Porte, Jr. (Eds), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1990, 346-356.
16. Fichaux, F., and R. Bonnafous. Responsiveness and memory of the pancreatic B-cells to the insulin secretagogues D-glucose and L-arginine in prediabetic and diabetic rabbits. Pancreas 7: 585-594, 1992.

17. Fozard, J. R., and J. Koch-Weser. Pharmacological consequences of inhibition of polyamine biosynthesis with DL-difluoromethylornithine. J. Pharmacol. Sci. 3: 107-110, 1982.
18. Fozard, J. R., and M. L. Part. Methods for the study of the experimental interruption of pregnancy by ODC inhibitors: effects of DL-DFMO. In: Methods in Enzymology, vol. 94, Tabor, H., and Tabor, C. W. (Eds) Academic Press, New York, 1983, 213-216.
19. Frydman, J., O. Ruiz, E. Robetto, J. M. Dellacha, and R. B. Frydman. Modulation of insulin induced ornithine decarboxylase by putrescine and methyl putrescine in H-25 hepatoma cells. Mol. Cell. Biochem. 100: 9-23, 1991.
20. Gillet, J. M., J. Charlier, G. Boné, and P. L. Mulamba. Plasmodium berghei: Inhibition of the sporogonous cycle by alpha-difluoromethylornithine. Exp. Parasitol. 56: 190-193, 1983.
21. Grillo, M. A. Metabolism and function of polyamines. Int. J. Biochem. 17: 943-948, 1985.
22. Grossie, V. B., D. M. Ota, J. A. Ajani, and K. Nishioka. Effect of intravenous alpha-difluoromethylornithine on the polyamine levels of normal tissue and a transplantable fibrosarcoma. Cancer Res. 47: 1836-1840, 1987.
23. Guyton. Insulina, glucagon y diabetes mellitus. En: Tratado de Fisiología Médica. Octava edición. Mc Graw Hill Madrid, 1991, 893-906.
24. Haarstad H., T. Skel, and H. Petersen. Inhibition of polyamine synthesis by alpha-difluoromethylornithine and its effects on pancreatic secretion and growth in the rat. Scand. J. Gastroenterol. 24: 733-744, 1989.
25. Haarstad, H., A. Winnberg, and H. Petersen. Effects of a cholecystokinin like peptide on DNA and polyamine synthesis in the rat pancreas. Scand. J. Gastroenterol. 20: 530-538, 1985.

26. Haddox, M. K., and D. R. Haddock. Ornithine decarboxylase expression in normal and neoplastic growth. In: *Advances in Polyamine Research*, vol. 3. Caldera, C. M., Zappia, V. and, Bachrach, V. (Eds). Raven Press, New York, 1981, 275-286.
27. Haeghele, K. D., R. G. Alken, J. Grove, P. J. Schechter, and J. Koch-Wester. Kinetics of α -DFMO: an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase. Clin. Pharmacol. Ther. 30: 210-217, 1981.
28. Hanson, W. L., M. M. Bradford, W. L. Chapman, Jr., V. B. Waits, P. P. McCann, A. Sjoerdsma. alpha-Difluoromethylornithine: A promising lead for preventive chemotherapy for coccidiosis. Am. J. Vet. Res. 43: 1651-1653, 1982.
29. Harris, M., and G. Cahill, members of NIH Diabetes Data Group Workshop. Diabetes 28:1039-1057, 1979.
30. Harrison, S. A., R.E. Lewis, J.K. Klarland, A. D. Bradford, K. A. Yagaloff, and M. P. Czech. Mechanism of action of insulin. In: *Diabetes Mellitus: Theory and Practice*. 4th edition. Rifkin, H., and D. Porte, Jr. (Eds), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1990, 61-70.
31. Heald, J. P. Changes in ornithine decarboxylase during early implantaion in the rat. Biol. Reprod. 20: 1195-1199, 1979.
32. Heby, O. Role of polyamine in the control of cell proliferation and differentiation. Differentiation 19: 1-20, 1981.
33. Heby, O. Putrescine, spermidine, and spermine. News Physiol. Sci. 1: 12-15, 1986.
34. Heby, O, and L. Persson. Molecular-genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. T. I.B.S. 15: 153-158, 1990.

35. Hougard, D. M., J. H. Nielsen, and L. I. Larsson. Localization and biosynthesis of polyamines in insulin-producing cells. Biochem. J. 238: 43-47, 1986.
36. Itoh, N., and H. Okamoto. Translational control of proinsulin synthesis by glucose. Nature Lond. 283: 100-102, 1980.
37. Kahn, R. C., y Y. Shechter. Insulina, agentes hipoglucemiantes orales y farmacología del páncreas endocrino. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Octava edición. Goodman A., T. Rall, A. S. Nies y P. Taylor (Eds). Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 1991, 1415-1445.
38. Kaye, A., I. Icekson, and H. R. Lindner. Stimulation by estrogens of ornithine and S-adenosylmethionine decarboxylase in the immature rat uterus. Biochim. Biophys. Acta 252: 150-159, 1971.
39. Kern, H. F. Fine structure of the human exocrine pancreas. In: The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease. 2nd edition. Vay Liang W. Go et al. (Eds) Raven Press, Ltd., New York, 1993, 9-19.
40. Kitabchi, A. E., W. C. Duckworth, F. B. Stentz. Insulin synthesis, proinsulin and C peptides. In: Diabetes Mellitus: Theory and Practice. 4th edition. Rifkin, H., and D. Porte, Jr. (Eds), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1990, 71-88.
41. Korc, M. Normal function of the endocrine pancreas. In: The Pancreas: Biology, Pathology and Disease. 2nd edition. Vay Liang W. Go, et al. (Ed), Raven Press. Ltd., New York, 1993, 751-757.
42. Lacy, P. E., and M. H. Greider. Anatomy and Ultrastructural organization of pancreatic islets. In: Endocrinology. vol 2. Degroot, L. J., Cahill G. F., Jr., Martini L., Nelson D. H., M. Oddell W. D., Potts J. T., Stemberger E, and Winegrad A. J. (Eds) Grune & Stratford, New York, 1979, 907-919.

43. Lienhard, G. E., J. W. Slot, D. E. Jamas, and M. M. Mueckler. How cells absorb glucose. Scientific American 34-39, 1990.
44. Logsdon, C. D., F. Alves, and S. Rosewicz. Role of polyamines in glucocorticoid effects on pancreatic acinar AR42J cell growth and differentiation. Am. J. Physiol. 262: G285-G290, 1990.
45. Löser C., V. Cleffmann, F. Alves, U. R. Fölsch, and W. Creutzfeldt. Ornithine decarboxylase and polyamine biosynthesis in pancreatic adaptation. Adv. Exp. Med. Biol. 250: 379-388, 1988.
46. Löser C., V. R. Fölsch, V. Cleffmann, R. Nustede, W. Creutzfeldt. Role of ornithine decarboxylase and polyamine in camostatate (Foy-305)-induced pancreatic growth in rats. Digestion 43: 98-112, 1989.
47. Luk, G. D., and P. Yang. Polyamines in intestinal and pancreatic adaptation. Gut 28 (S1): 95-101, 1987.
48. Mamont, P. S., M. C. Duchesne, J. Grove, and P. Bey. Antiproliferative properties of DL, alpha-difluoromethylornithine in cultured cells. A consequence of the irreversible inhibition of ornithine decarboxylase. Biochim. Biophys. Res. Commun. 81: 58-66, 1978.
49. Marton, L. J: Polyamines and brain tumors: relationship to patient monitoring and therapy. In: Advances in Polyamine Research, vol. 3. Caldera, C. M., Zappia, V. and, Bachrach, V. (Eds). Raven Press, New York, 1981, 425-430.
50. Marton, L. J., and B. G. Feuerstein. Polyamine-DNA interactions: Possible site of new cancer chemotherapeutic intervention. Pharm. Res. 3: 311-317, 1986.

51. Marton, L. J., V. A. Levin, S. J. Hervatin, J. Koch-Weser, P. P. McCann, and A. Sjoerdsma. Potentiation of the antitumor therapeutic effects of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea by difluoromethylornithine, an ornithine decarboxylase inhibitor. Cancer Res. 41: 4426-4431, 1981.
52. Marx, M., C. M. Townsend, Jr., S. C. Barranco, E. J. Glass, and J. C. Thompson. Treatment of hamster pancreatic cancer with alpha-difluoromethylornithine, an inhibitor of polyamine biosynthesis. JNCI 79: 543-548, 1987.
53. McCann, P. P., C. J. Bacchi, W. L. Hanson, and H. C. Nathan. Methods for the study of the treatment of protozoan diseases by inhibitors of ODC. In: *Methods in enzymology*, vol 4. Tabor, H., White Tabor, C., Hutner, S. H., and Sjoerdsma, A. (Eds). Academic Press, New York, 1983.
54. McCann, P. P., C. J. Bacchi, W. L. Hanson, G. D. Cain, H. C. Nathan, S. H. Hutner, and A. Sjoerdsma. effect on parasitic protozoa of DL-difluoromethylornithine -an inhibitor of ornithine decarboxylase. In: *Advances in Polyamine Research*, vol. 3. Caldera, C. M., Zappia, V. and, Bachrach, V. (Eds). Raven Press, New York, 1981, 97-110.
55. Méndez, J. D. Poliaminas. En: *Bioquímica e Inmunología*, vol. 2 Hicks J. J. y Zagoya, J. C. (Eds). Facultad de Medicina, UNAM; México D. F., 1989, 366-385.
56. Méndez, J. D. Polyamines and human reproduction. In: *The Physiology of Polyamines*, vol. 1. Bachrach, U., and H. Eimer, Y. (Eds) CRC Press, Inc., Florida, 1989, 23-38.
57. Méndez, J. D., y J. J. Hicks. Las poliaminas y el sistema reproductor de la hembra. Ginec. Obstet. Mex. 302: 157-164, 1982.
58. Méndez, J. D., y J. J. Hicks. Metabolismo de las poliaminas en diferentes condiciones fisiológicas de la mujer. Ginec. Obstet. Mex. 325: 135-138, 1984.

59. Metcalf, B. W., P. Bey, C. Danzin, M. J. Jung, P. Casara, and J. P. Vevert. Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E. C. 4.1.1.17.) by substrate and product analogues. J. Am. Chem. Soc. 100: 2551-2553, 1978.
60. 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.
61. Nielsen, J. H. Dissociation between insulin secretion and DNA synthesis in cultured pancreatic islets. Biomed. Biochim. Acta 44: 161-166, 1985.
62. Nielsen, J. H. Mechanisms of pancreatic B-cell growth and regeneration: studies on rat insulinoma cells. Exp. Clin. Endocrinol. 93: 277-285, 1989.
63. Olanrewaju, H., L. Patel, and E. R. Seidel. Trophic action of local intraileal infusion of insulin like growth factor I: polyamine dependence. Am. J. Physiol. 263: E282-E286, 1992.
64. Ono, M., H. Inoue, F. Suzuki, and Y. Takeda. Studies on ornithine decarboxylase from the liver of thioacetamide-treated rats. Purification and some properties. Biochim. Biophys. Acta 284: 285-297, 1972.
65. Ota, D. M., V. B. Grossie, Jr., J. A. Ajani, L. C. Stephens, and K. Nishioka. Red blood cell polyamine levels and host toxicity during continuous alpha-difluoromethylornithine infusion. Int. J. Cancer 38: 245-249, 1986.
66. Pegg, A. E. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. Biochem. J. 334: 249-262, 1986.
67. Pegg, A. E., C. Conover, and A. Wrona. Effects of aliphatic diamines on rat liver ornithine decarboxylase activity. Biochem. J. 170: 652-660, 1978.

68. Pegg, A. E., and P. P. McCann. Polyamine metabolism and function. Am. J. Physiol. 243 (Cell Physiol. 12): C212-C221, 1982.
69. Pegg, A. E., K. A. McGovern, and L. Wiest. Decarboxylation of alpha - difluoromethylornithine by ornithine decarboxylase. Biochem J. 241: 305-307, 1987.
70. Pritchard, M. L., J. E. Seely, H. Pösö, L. S. Jefferson, and A. E. Pegg. Binding of radioactive α -difluoromethylornithine to rat liver ornithine decarboxylase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100: 1597-1603, 1981.
71. Romijn, J. C., C. Verkoelen, and T. A. W. Splinter. Problems of pharmacokinetic studies on alpha-difluoromethylornithine in mice. Cancer Chemother. Pharmacol. 19: 30-34, 1987.
72. Russel, D. H. Clinical relevance of polyamines. CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 18: 261, 1983.
73. Sauer, D., P. Martin, P. R. Allegrini, R. Bernasconi, J. Amacker, and G. E. Fagg. Differing effects of alpha - difluoromethylornithine and CGP 40116 on polyamines levels and infarct volume in a rat model of focal cerebral ischaemia. Neuroscience Letters 141: 131-135, 1992.
74. Schuber, J. Influence of polyamines on membrane functions. Biochem. J. 260: 1-10, 1989.
75. Singh, A. B., T. J. Thomas, T. Thomas, M. Singh, and R. A. Mann. Differential effects of polyamine homologues on the prevention of DL, alpha -difluoromethylornithine mediated inhibition of malignant cell growth and normal immune response. Cancer Res. 52:1840-1847, 1992.
76. Sjoerdsma, A., and P. J. Schechter. Chemotherapeutic implications of polyamine biosynthesis inhibition. Clin. Pharmacol. Ther. 35: 287-300, 1984.

77. Sjöholm, A. Phorbol ester stimulation of pancreatic B-cell replication, polyamine content and insulin secretion. FEBS 294: 257-260, 1991.
78. Sjöholm, A. Role of polyamines in the regulation of proliferation and hormone production by insulin-secreting cells. Am. Physiol. Soc. 264: C501-C518, 1993.
79. Sjöholm, A. Inhibitory effects of cyclosporin A on rat insulinoma cell proliferation, polyamine content and insulin secretion. Mol. Cell. Endocrinol. 99: 21-24, 1994.
80. Sjöholm, A., A. Funakoshi, S. Efendic, C. G. Ostenson, and C. Hellerström. Long term inhibitory effects of pancreastatin and diazepam binding on pancreatic B-cell deoxyribonucleic acid replication, polyamine content, and insulin secretion. Endocrinology 128: 3277-3282, 1991.
81. Sjöholm, A., N. Welsh, P. W. Bankston, V. Hoftiezer, and C. Hellerström. Increased glucose oxidation and contents of insulin and ATP in polyamine-depleted rat insulinoma cell (RINm5F): Biochem. J. 277: 533-540, 1991.
82. Sjöholm, A., N. Welsh, and C. Hellerström. Lithium increases DNA replication, polyamine content, and insulin secretion by rat pancreatic B-cells. Am. J. Physiol. 262 (Cell Physiol 31): C391-C395, 1992.
83. Sjöholm, A., N. Welsh, S. Sandler, and C. Hellerström. Role of polyamine in mitogenic and secretory responses of pancreatic B-cells to growth factors. Am. J. Physiol. 259 (Cell Physiol. 28): C828-C833, 1990.
84. Slotkin, T. A., J. Bartolome, D. Persons, and W. L. Whitmore. Polyamines in brain and heart of the neonatal rat: Effects of inhibitors of ornithine decarboxylase and spermidine synthase. Life Sci. 35: 1125-1131, 1981.

85. Slotkin, T. A., J. Seidler, P. A. Trepanier, W. L. Whitmore, L. Lerea, G. A. Barnes, S. J. Weigel and J. Bartolome. Ornithine decarboxylase in tissue of neonatal rat: effects of alpha -difluoromethylornithine, a specific, irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase. J. Pharmacol. Exp. Ther. 222: 741-745, 1982.
86. Stace, N. H., M. Hosomi, S. Vaja, G. M. Murphy, R. M. Dowling. Polyamine synthesis inhibitor, difluoromethylornithine (DFMO) does not prevent the pancreatic hyperplasia induced by pancreatico-biliary division (PBD) in the rat. Gut 25: A1159, 1984.
87. Steck, E. A. The chemotherapy of protozoal infections of man. J. Protozool. 28: 10-16, 1981.
88. Stjeinborng, L., O. Heby, I. Holm, and L. Persson. On the translational control of ornithine decarboxylase expression by polyamines. Biochim. Biophys. Acta 1090: 188-194, 1991.
89. Swenne, I. The role of glucose in the in vitro regulation of cell cycle kinetics and proliferation of fetal pancreatic B-cells. Diabetes 31: 754-760, 1982.
90. Thams, P., K. Capito, and C. J. Hedekov. An inhibitory role for polyamines in protein kinase C activation and insulin secretion in mouse pancreatic islets. Biochem. J. 237: 131-138, 1986.
91. Thams, P., K. Capito, and C. J. Hedekov. Polyamine-enhanced casein kinase II in mouse pancreatic islets. Diabetologia 29: 888-892, 1986.
92. Tofilon, P. J. Polyamine depletion and drug-induced chromosomal damage: new results. Science 258: 2349, 1992.
93. Tomas, T., and D. T. Kiang. Additive growth inhibitory effects of DL-difluoromethylornithine and antiestrogens in MCF breast cancer cell line. Biochem. Biophys. Res. Commun. 143: 424-430, 1987.

94. Tome, M. E., S. M. Fiser, and E. W. Gerner. Consequences of aberrant ornithine decarboxylase regulation in rat hepatoma cells. J. Cell. Physiol. 158: 237-244, 1994.
95. Tyms, A. S., B. K. Rawal, H.M. Naim, and J. D. Williamson. The antiviral effect of inhibitors of polyamine metabolism. In: Advances in Polyamine Research, vol. 4. Bachrach, U., Kaye, A., and Chayen, R., (Eds), Raven Press, New York, 1983, 507-517.
96. Veorhess, J. J. Polyamines and psoriasis. Arch. Dermatol. 115: 943-944, 1979.
97. Volk, B. M. Pathology of the diabetic pancreas. In: Diabetes Mellitus: Theory and Practice. 4th edition. Rifkin, H., and D. Porte, Jr. (Eds), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1990, 341-345.
98. Warrell, R.P., C. J. Coonley, and J.H. Burchenal. Sequential inhibition of polyamines biosynthesis. Cancer Chemother. Pharmacol. 11: 134-136, 1983.
99. Welsh, N. A role for polyamines in glucose-stimulated insulin gene expression. Biochem. J. 271: 393-397, 1990.
100. Welsh, N., and A. Sjöholm. Polyamines and insulin production in isolated mouse pancreatic islets. Biochem. J. 252: 701-707, 1988.
101. Whaun, J. M., and N. D. Brown. Ornithine decarboxylase inhibition and the malaria infected red cell: A model for polyamine metabolism and growth. J. Pharmacol. Exp. Ther. 233: 507-511, 1985.