
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**“ LAS POLIAMINAS COMO BIOMARCADORES DEL CRECIMIENTO
NEOPLÁSICO EN EL MODELO DE LINFOMA L5178Y EN RATONES
BALB/c”**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

CUAUHTÉMOC SANDOVAL SALAZAR

Las Agujas, Zapopan, Jal., enero de 2004



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. CUAUHTÉMOC SANDOVAL SALAZAR
PRESENTE.**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **Tesis** con el título: "**LAS POLIAMINAS COMO BIOMARCADORES DEL CRECIMIENTO NEOPLÁSICO EN EL MODELO DE LINFOMA L5178Y EN RATONES BALB/c**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **M.C. RAMÓN REYNOSO OROZCO** y como asesores el/la **DRA. ANNE SANTERRE LUCAS** y **DRA. ANA MARÍA PUEBLA PÉREZ**.

ATENTAMENTE

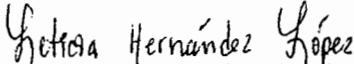
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jal., 5 de enero del 2004


DRA. MÓNICA ELIZABETH RÍOS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. M.C. RAMÓN REYNOSO OROZCO.-Director del Trabajo
c.c.p. DRA. ANNE SANTERRE LUCAS.- Asesor del Trabajo
c.c.p. DRA. ANA MARÍA PUEBLA PÉREZ.- Asesor del Trabajo
c.c.p. Archivo

MERL/LHL/mam

Forma C

**C. DRA. MONICA ELIZABETH RIOJAS LOPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACION
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.**

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis.

Que realizó el Pasante de Biología **CUAUHTÉMOC SANDOVAL SALAZAR** código 394521734 con el título: **“LAS POLIAMINAS COMO BIOMARCADORES DEL CRECIMIENTO NEOPLÁSICO EN EL MODELO DE LINFOMA L5178Y EN RATONES BALB/c”**, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y, en su caso, programación de fecha de examen de respectivo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Zapopan, Jal., enero 6 del 2011



El Director
M C. RAMON REYNOSO
OROZCO

El Asesor
Dra. ANNE SANTERRE
LUCAS

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BILOGÍA

El Asesor
Dra. ANA MARIA PUEBLA
PEREZ

SINODALES

- 1.- DR. ALFONSO ENRIQUE ISLAS RODRÍGUEZ
- 2.-DR. MARIO ALBERTO RUIZ LÓPEZ
- 3.- M.C. ROSA MARIA DOMÍNGUEZ ARIAS
- 4.- M.C.MARIO REAL NAVARRO

La presente tesis fue dirigida por el M.C. Ramón Reynoso O. y los asesores Dra. Anne Santerre L. y Ana María Puebla P. en el Laboratorio de Cromatografía del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis y amigo Ramón Reynoso y asesor Anne Santerre por brindarme el apoyo, la confianza y todos los conocimientos necesarios para realizar con éxito esta investigación.

A mis sinodales por dedicarme tiempo y por todas sus aportaciones para mejorar este trabajo.

A mis padres Luciano Sandoval y María Salazar por todo su apoyo y sobre todo por creer en mi ayudándome a ser mejor y realizar mis metas. *Gracias*

A mis hermanos Antonia, Francisco, Inés y Juan por sus consejos y apoyo moral.

A todos mis amigos Miros, Faby, Moni, Leny, Helen, Marlene, Espe, Víctor, Tito, Lalo, Poncho, Sergio, Juanca, Alex, Javier, Nico, Ivan y a todas a aquellas personas que estuvieron siempre ahí cuando mas los necesite

A Lucia por su tiempo, cariño y comprensión dado.

ABREVIATURAS

PAs	Poliaminas
Pu	Putrescina
Spm	Espermina
Spd	Espermidina
ArDC	Arginina descarboxilasa
SpmS	Espermina sintasa
SpdS	Espermidina sintasa
DFMO	Difluorometilornitina
SSAT	Espermidina-Espermina acetilasa
Sam-DC	S-Adenosilmetionina descarboxilasa
AZ	Antizima
RBC	Células rojas sanguíneas
TPN	Nutrición parenteral total
TCA-HCl	Ácido tricloroacético-ácido clorhídrico
PAO	Poliaminaoxidasas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

Resumen

En mamíferos las concentraciones de PAs en fluidos extracelulares reflejan los eventos intracelulares que podrían ser útiles como indicadores inmediatos de éxito en terapias contra enfermedades; que involucran el crecimiento celular alterado. El monitoreo diario de los niveles de PAs en plasma y orina en muchos estados patológicos podrían proveer un marcador bioquímico no invasivo para la actividad de enfermedades existentes, de respuesta a terapias o para demostrar la eficiencia de drogas. Las PAs juegan un papel importante en el crecimiento neoplásico y normal de las células. Las células en proliferación contienen cantidades incrementadas de PAs, sus concentraciones varían como una función del ciclo celular, y estas moléculas son elementos vitales para la célula. En un contexto clínico, respecto a la terapia se debe considerar el metabolismo de las PAs en toda su extensión, a nivel del organismo completo, y no solo en sus aspectos intracelulares. Por otra parte la cromatografía por intercambio iónico y la de alta resolución (HPLC) automatizadas, con derivatización pre y post columna con detección por fluorescencia o electroquímica son frecuentemente utilizadas para la cuantificación simultánea de cantidades picomolares de PAs. Los estudios que utilizan a ratones transgénicos que sobre expresan las enzimas biosintéticas de PAs, apoyan un papel de las mismas en la carcinogénesis. En el presente trabajo se confirma la utilidad de las PAs Pu, Spd y Spm, así como de su precursor Orn, donde por cromatografía de intercambio iónico se demuestran variaciones en los niveles de PAs durante el desarrollo neoplásico en el modelo de linfoma murino L5178Y *in vivo*. Los resultados obtenidos aquí permitirán aplicar estos hallazgos en el seguimiento de esquemas de tratamiento para el cáncer en este modelo.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	iv
Resumen.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Historia de las poliaminas.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
1. Las poliaminas.....	4
2. Efectos de las PAs en las interacciones proteínas-ADN.....	4
3. Efectos fisiológicos de las PAs en los vegetales.....	6
4. Biosíntesis y catabolismo de poliaminas.....	7
5. Uso de inhibidores.....	9
6. Catabolismo de poliaminas.....	10
7. Homeostasis.....	10
8. Distribución de las poliaminas.....	11
9. Las poliaminas como biomarcadores.....	12
10. Poliaminas y cáncer.....	13
11. Cromatografía en columna.....	15
12. Cromatografía de intercambio iónico.....	18
III. JUSTIFICACIÓN.....	20
IV. HIPÓTESIS.....	21
V. OBJETIVO.....	22
VI. METODOLOGÍA.....	23
1. Material biológico.....	23
2. Preparación y obtención de muestras biológicas.....	23
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
VIII. CONCLUSIONES.....	37
IX. PERSPECTIVAS.....	38
X. LITERATURA CITADA.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Biosíntesis de poliaminas en célula de mamífero.....	11
2. Esquema de proceso de separación proteica en columna.....	17
3. Principio de la cromatografía de intercambio iónico.....	19
4. Porcentaje de supervivencia de ratones inoculados con 2×10^4 células por vía i.p.....	27
5. Espermidina en células peritoneales.....	28
6. Espermidina en esplenocitos.....	29
7. Espermidina en leucocitos circulantes.....	30
8. Espermina en mesotelio.....	31
9. Ornitina en hígado.....	32
10. Putrescina en orina.....	33

ÍNDICE DE CUADROS

I. Algunas poliaminas conocidas.....	2
II. Biosíntesis de poliaminas.....	8
III. Clasificación de las técnicas cromatográficas.....	16
IV. Ciclo programado al sistema cromatográfico.....	25

I. INTRODUCCION

Historia de las Poliaminas

Las poliaminas (PAs) son caracterizadas en 1930, incluyen a los componentes: putrescina (Pu), cadaverina, espermina (Spm) y espermidina (Spd). Pu y cadaverina son las principales diaminas y fueron descubiertas en bacterias. La Spd una triamina y la Spm una tetramina, contienen aminos primarias (R_5NH_2) y secundarias (R_1R_2NH). La Spd y la Spm son derivadas de Pu.

La agmatina es un monoguanido derivado de Pu, que fue separado mediante hidrólisis de tejido animal en 1910 por A. Kossel, quien propuso que era un producto de la descarboxilación de la arginina. Este es un intermediario frecuente en la conversión de arginina a Pu. En 1887 Brieger aisló una base a partir de cultivos de *Vibrio cholerae*, cuya composición elemental corresponde 1,3-diaminopropano. La parte aminopropil fue reconocido en 1920 como Spm y 1,3-diaminopropano, y fue caracterizada por Wrede y Cols, en su identidad como una PA metabólicamente activa se desprende del trabajo nutricional de Herbst alrededor de 1950 y de estudios posteriores de aminos oxidasas. Dos clases adicionales de PAs naturales fueron descubiertas recientemente, las aminos terciarias (R_3N) y las aminos cuaternarias (R_4N+OH). Numerosas PAs naturales fueron aisladas y se observó que contenían derivados de diaminopropano y diaminopentano. Se encontró que dos PAs naturales contenían un átomo de carbono en exceso y fueron nombrados homoespermidinas; una Spd simétrica, la bis(aminobutil) amina, se encuentra en algunas plantas y bacterias, mientras que la homoespermidina asimétrica, la aminopropil-cadaverina, es encontrada en células relativamente ricas en cadaverina y carente de Pu. (Cohen, 1998).

Cuadro I. Algunas poliaminas conocidas

NOMBRE	FORMULA QUÍMICA
Agmatina	$\text{NH}_2\text{C}(\text{NH})\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Aminobutilcanavalmina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Aminopentilnoespermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$
Aminopropilcadaverina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$
Aminopropilcanavalmina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Aminopropilhomoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Aminopropilhomoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Bis(aminobutil)noespermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Bis(aminopropil)cadaverina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Bis(aminopropil)homoespermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Cadaverina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$
Caldohexamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Caldopentamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Diaminopropano	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
<i>Espermidina</i>	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
<i>Esperrina</i>	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Homocaldohexamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Homoespermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Homoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Homopentamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Homotermohehexamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
N^{15} -Aminobutilhomoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{N}((\text{CH}_2)_4\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
N^6 -Metilagmatina	$\text{NH}_2\text{C}(\text{NCH}_3)\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Noespermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Noespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
<i>Putrescina</i>	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Termoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Termohehexamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

(Adaptado de Morgan 1998).

Tanto la Spm como la Spd están implicadas en diversos procesos fisiológicos que comparten una relación íntima con la multiplicación y crecimientos celulares. Son factores de crecimiento de las células cultivadas de mamíferos y bacterias que intervienen en la estabilización de células intactas, organelos subcelulares y membranas. Como resultado de sus múltiples cargas positivas las PAs se unen con facilidad a los polianiones como el ADN y el ARN y también han sido implicadas en procesos como la estimulación de la biosíntesis del ADN y del ARN y la estabilización y el empaquetamiento del ADN en los bacteriófagos. Las PAs también ejercen efectos diversos sobre la síntesis proteínica y actúan como inhibidores de enzimas en las que se incluyen las proteínas cinasas (Hurta, 2000).

II. ANTECEDENTES

Las poliaminas

Las PAs Pu, Spd y Spm se consideran como reguladores del desarrollo celular por su efecto sobre el crecimiento, la división y diferenciación celular. Por su carácter policationico pueden unirse a moléculas cargadas negativamente tales como ácidos nucleicos, proteínas o fosfolípidos, alterando la expresión génica y la actividad de ciertas enzimas, así como variando la fluidez y la permeabilidad de las membranas biológicas (Gallardo, *et al* 1996).

Los niveles de PAs celulares son regulados por múltiples rutas metabólicas como son: 1) la síntesis *de novo* a partir de sus aminoácidos precursores, 2) los mecanismos de liberación, 3) de incorporación que adquieren las PAs de la dieta y de microorganismos intestinales, 4) así como de pasos intermedios de degradación y de interconversión (Kobayashi, 2003). El papel de las PAs como facilitadoras del crecimiento celular, en numerosos estudios han mostrado sus habilidades para proteger a las células de la apoptosis. Aun así las PAs también tienen una función en la inducción de la muerte celular. La base de esta diversidad de respuestas celulares todavía no es conocida (Thomas y Thomas, 2001).

Efectos de las poliaminas en las interacciones proteína-ADN

La interacción de las PAs con el ADN fue de los primeros descubrimientos que sugerían la estabilización de la doble cadena por estos policationes. Dicha interacción es llevada a cabo por uniones o enlaces entre las cargas negativas de los grupos fosfato y las positivas de los grupos amino de las PAs (Cohen, 1998). Además de esta fuerza de neutralización, las PAs interaccionan con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, almacenadas en los surcos mayores y menores, y forman múltiples interacciones dependiendo del ambiente iónico.

La mayoría de las señales de las rutas de transducción se interceptan con rutas biosintéticas de PAs y la regulación de sus niveles intracelular. La unión directa de las PAs al ADN y su habilidad para modular las interacciones ADN-proteína son importantes en los mecanismos de acción de estas moléculas en la proliferación celular (Thomas y Thomas, 2001).

En eucariotas, las PAs, las histonas y proteínas no histonas son importantes en la organización estructural de la cromatina; además la condensación del ADN inducido por PAs es importante para las funciones celulares *in vivo* (Sauve, *et al.* 1999 y Hougaard, *et al.* 1987).

Además en estudios de inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo específico anti-Spm (SPM-2) se mostró una alta tinción en los núcleos de células mitóticas, indicando la acumulación de Spm en los cromosomas de las células.

Otro fenómeno interesante asociado con las interacciones PAs-ADN es la habilidad de ciertas secuencias de ADN para sufrir transiciones conformacionales en la presencia de PAs (Behe y Felsenfeld 1981 y Thomas y Messner, 1988). Las conformaciones de ADN-B y ADN-Z tienen distintas características ya que los grupos fosfato están más expuestos en el ADN-Z; hay 12 pares de bases por vuelta comparado con 10 pares de bases por vuelta en el ADN-B; y el surco mayor del ADN está reemplazado por un canal poco profundo (Rich y Wang, 1984 y Herbert y Rich., 1999). El ADN-B con giro hacia la derecha puede ser convertido en ADN-Z de giro hacia la izquierda en la presencia de una concentración molar de PAs (Thomas, 1988 y Rich, 1984). La conformación ADN-Z es inducido principalmente por bloqueo de las secuencias alternas purina-pirimidina y se cree que juega un papel en el control transcripcional (Rich y Wang, 1984). Estos cambios afectarían la reactividad del ADN con las proteínas, carcinógenos y otras moléculas que se unen a él. Evidencia de cristalografía de rayos X muestran una unión estrecha de la Spm con el ADN en la conformación del ADN-Z (Egli, *et al.* 1991). La Spm se une alrededor del ADN tanto por contactos iónicos tanto con las cargas de fosfatos como por contactos hidrofóbicos de las bases (Egli, *et al.* 1991). Estos modos diferentes de interacciones provocan la formación del ADN-Z a una concentración menor que los cationes inorgánicos como el Mg^{2+} . A diferencia de las PAs, el Mg^{2+} es un punto de cargas y de contacto a través del cual las moléculas que se pueden hidratar son intercambiadas constantemente con el solvente.

El desenrollamiento del ADN en sitios que van a ser transcritos, es otro mecanismo por el cual las PAs podrían intervenir en la unión de las proteínas (elementos de respuesta) que reconocen a un gen regulador (Feuerstein, *et al.* 1986 y 1989). Las PAs promueven el desenrollamiento del ADN neutralizando las cargas negativas en los grupos fosfato del ADN, reduciendo el requerimiento de energía para el enrollamiento, facilitando el desarrollo de las interacciones proteína-ADN. El enrollamiento del ADN, por sí mismo es la ruta principal para la regulación transcripcional de la expresión génica. Además, la versatilidad de las PAs en el desenrollamiento del ADN podría influir para facilitar la transcripción (Becker, *et al.* 1995).

Un blanco potencial para las PAs en la regulación génica es el sitio en el que el factor de transcripción se une al ADN. El factor de transcripción que se une al ADN y el desenrollamiento del ADN son procesos relacionados, dado que muchas proteínas que se unen al ADN ejercen su acción por su habilidad de desenrollar al ADN.

Estudios recientes de la transcripción inducida por estrés en ADN circular muestran que la rigidez y el enrollamiento del ADN inducidos por la interacción de las PAs, dentro de los canales menores principales del ADN no pudieron ser simulados por otros polímeros: polilisisina, poliarginina o histonas (Thomas y Thomas, 2001).

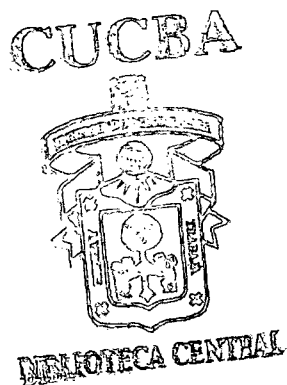
Por otro lado, en las plantas se conoce de la importancia de estas moléculas que aunque son ubicuas no parecen presentar sólo los efectos que se les atribuyen en mamíferos y organismos inferiores, a continuación referimos aquellos efectos ya establecidos en su fisiología.

Efectos fisiológicos de las poliaminas en los vegetales

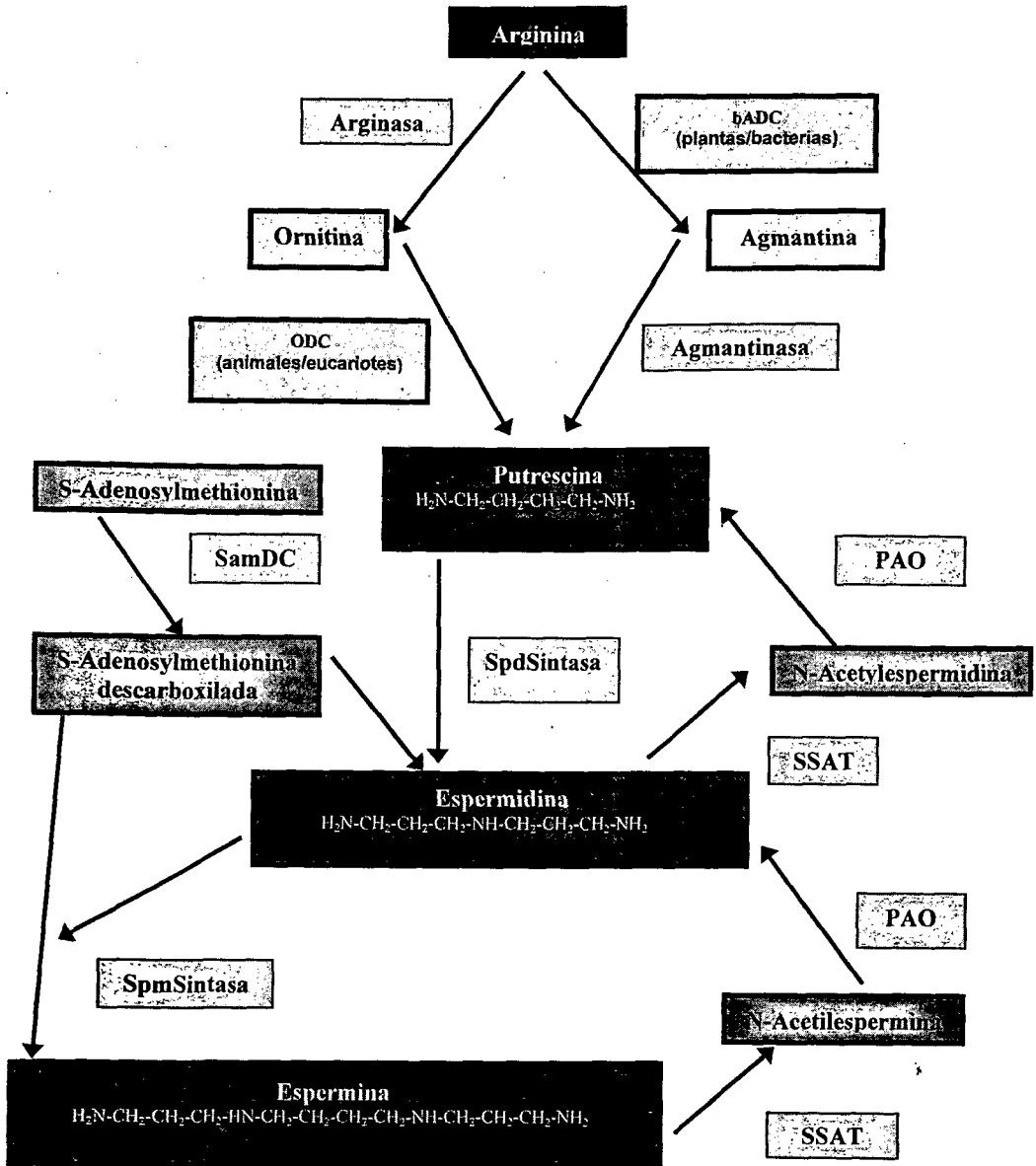
- 1- Las PAs son esenciales para completar los ciclos de división celular.
- 2- Inhiben o retrasan los procesos metabólicos asociados a la senescencia de los tejidos.
- 3- Incrementan su contenido en situaciones de estrés (deficiencias nutricionales, bajas y altas temperaturas, salinidad) aunque no se sabe si las PAs dan origen a las reacciones de tolerancia ó son una respuesta a consecuencia del estrés.
- 4- Tienen capacidad antioxidante y estabilizadora de las membranas.
- 5- Diferenciación de embriones en cultivo de tejidos.
- 6- Las PAs tienen efecto sobre la resistencia a virus y hongos en ciertas plantas.
- 7- Aumentan la conjugación en la pared celular durante el envejecimiento celular.
- 8- Las PAs son intermediarios de numerosos alcaloides. (Azcon-Bieto, 2000).

Biosíntesis y catabolismo de las poliaminas

La ornitina descarboxilasa (ODC) inicia la síntesis de las PAs mediante la producción de la diamina Pu. En algunas plantas y bacterias la arginina descarboxilasa (ArDC) inicia una ruta alternativa de dos pasos hacia la Pu. Posteriormente, un grupo aminopropil, derivado de una metionina por la descarboxilación de S-Adenosilmetionina, se adiciona a la Pu, para formar Spd y un segundo grupo aminopropil se adiciona a la Spd para formar Spm por medio de las Spd sintasa (SpdS) y Spm sintasa (SpmS), respectivamente. Este proceso biosintético puede ser revertido por series de reacciones catabólicas a cargo de la Spd-Spm acetilasa (SSAT), un paso que es de velocidad limitada para la conversión de Spm a Spd y de Spd a Pu. La acetilación es seguida por la acción de la PA oxidasa (PAO). Las tres enzimas clave que controlan la velocidad de flujo a través de esta ruta, ODC, S-Adenosilmetionina descarboxilasa (SamDC) y SSAT, están sujetas a un control multi-nivel, siendo la degradación temprana especialmente prominente ya que dichas enzimas (ODC en particular) presentan una vida media muy corta. En la célula la entrada y la salida de estas moléculas afectan a la mezcla de PAs intracelulares.



Cuadro II. Biosíntesis de poliaminas



Podríamos considerar que la Pu, la Spd y Spm derivan de la L-ornitina y la porción diaminopropano de la L-metionina por medio de la formación de la S-adenosilmetionina. La ornitina descarboxilasa y la SamDC son enzimas inducibles cuya vida media es corta. En cambio, las espermidina y espermina sintetasa SpmS no son inducibles ni tampoco “extraordinariamente” lábiles.

De las enzimas biosintéticas de las PAs en los mamíferos, dos (ODC y SamDC) son de interés respecto tanto a la regulación de su expresión génica como a su potencial para la terapéutica química dirigida por enzimas. La vida media de la ODC (aproximadamente 10 minutos) es más corta que la de cualquier otra enzima conocida de los mamíferos y su actividad responde con rapidez y en forma sorprendente a numerosos estímulos. Incrementos de 10 a 200 veces en la actividad de la ODC siguen inmediatamente a la administración de hormona del crecimiento a cultivos de células de mamíferos, también a corticoesteroides, testosterona o factor del crecimiento epidérmico. Las PAs agregadas a los cultivos celulares inducen la síntesis de una antienzima, llamada antienzima (AZ), proteína que se une a la ODC e inhibe su actividad.

La SamDC es la única enzima eucariótica conocida que contiene piruvato ligado como un cofactor esencial (las descarboxilasas normalmente contienen fosfato de piridoxal, que no existe en la Sam-DC, tiene una vida media corta (1 a 2 horas) y responde a los promotores del crecimiento celular de una manera cualitativamente análoga a la de la ODC. La actividad de la S-adenosilmetionin Descarboxilasa es inhibida por la S-adenosilmetionina descarboxilada y activada por la Pu (Murray 1993).

Uso de Inhibidores

Las investigaciones que utilizan a los inhibidores biosintéticos de PAs indican que las alteraciones de sus niveles celulares modulan el crecimiento celular normal así como tumoral.

La difluorometilornitina (DFMO), un inhibidor específico y suicida de la ODC, se utiliza tanto para aislar a líneas celulares mutantes que producen a la ODC en exceso; como para inhibir la duplicación celular por medio de la terapia química dirigida a enzimas (Murray 1993). La DFMO es uno de los inhibidores más eficientes de la ODC. Al ser descarboxilada por ODC produce un intermediario electrofílico que reacciona con un centro nucleofílico del sitio activo de la enzima para formar un enlace covalente. Esta reacción produce inactivación irreversible de la enzima. Así, la deficiencia de PAs afecta la síntesis de ADN, ARN y proteínas. En ratones la DFMO tiene una acción supresora del

timo (glándula en donde ocurre la maduración de los linfocitos T). Ocasionalmente puede producir un decremento en el número de leucocitos, eritrocitos y plaquetas. (Qu, *et al.* 2003; Babbar y Gerner, 2003 y Ochoa, *et al.* 2001)

Estudios realizados recientemente han demostrado que la DFMO al ser administrada post-radiación o de forma oral da lugar a una reducción celular significativa en pacientes con glioblastoma; además de poderse usar como agente preventivo contra el neoplasias reduciendo la proliferación de cáncer de piel hasta en un 75% ya que esta induce la apoptosis en células invasoras cancerosas (Fischer 2003; Levin 2000 y O'Shaughnessy 1999).

Se han administrado dosis altas de DFMO a pacientes con cáncer y al parecer no se tiene gran efecto de toxicidad, pero aún así, no es totalmente certero ya que en ensayos recientes se presentaron casos de ototoxicidad donde las reacciones fueron una pérdida del oído, diarrea y leucopenia (Fischer *et al.* 2003; Levin *et al.* 2000 y O'Shaughnessy *et al.* 1999). De esta manera la DFMO demuestra ser una promesa en la prevención en determinados tipos de neoplasias (glioblastoma multiforme, cáncer de piel, cáncer de mama, gástrico e intestinales), así como en el tratamiento contra estos (Russell *et al.* 2000 y Takahashi *et al.* 2000).

Catabolismo de las poliaminas

En tejidos de mamíferos, la enzima poliamina oxidasa (PAO) presente en los peroxisomas hepáticos, oxida a la Spm y la convierte en Spd y a continuación oxida a la Spd convirtiéndola en Pu. Ambas fracciones diaminopropánicas son convertidas a β -aminopropionaldehído. Después la Pu es oxidada parcialmente a radical NH_4^+ y CO_2 por mecanismos que todavía no se han dilucidado. Sin embargo las mayores porciones de Pu y Spd son excretadas en la orina como conjugados, principalmente derivados acetilados (Murray, 1993).

Homeostasis de las poliaminas

Existen diferentes mecanismos para mantener los niveles óptimos de PAs dentro de la célula, su estudio detallado permite percatarnos de la trascendencia de estas moléculas en la homeostasis de la célula. Para incorporar PAs, la célula puede sintetizarlas o introducir las a través de transportadores específicos en la membrana celular. Para deshacerse de las mismas, la célula cuenta con mecanismos de interconversión, por

alimentos incluyendo los productos agrícolas (por ejemplo, hojuelas de avena, cereales, uvas y vino) se les ubica entre aquellos compuestos que posiblemente afectan el olor y el sabor (Cohen, 1998).

Las PAs tienen una amplia distribución en todo el organismo, pero la cantidad de estas depende del órgano o tejido donde se encuentren. La absorción está dada por una difusión pasiva en el tracto gastrointestinal por la ruta paracelular.

Estudios realizados en ratas muestran niveles más altos de Spd que Spm en el hígado. En tal investigación se encontró que también existe preferencia en la membrana celular hacia la Spd más que a la Spm; por ello las concentraciones de Spd son altas en la mayoría de los tejidos. Para el caso de la Spm su mayor concentración está en el riñón ya que debido a la alta competencia que existe con la Spd en el intestino, hígado y otros órganos es obligada a ser eliminada vía renal. Los niveles de Pu son bajos en la mayoría de los tejidos e incluso en el riñón ya que esta es metabolizada activamente por una diamina oxidasa presente en la sangre (Kobayashi, 2003).

Las poliaminas como biomarcadores

En mamíferos las concentraciones de PAs en fluidos extracelulares reflejan los eventos intracelulares que podrían ser útiles como indicadores inmediatos de éxito en terapias contra enfermedades; que involucran el crecimiento celular alterado. Las más complejas técnicas analíticas son requeridas para aislar, identificar y cuantificar a las PAs. La mayoría de los métodos requieren un procedimiento de extracción para extraer los derivados de aminoácidos que interfieren. El monitoreo diario de los niveles de PAs en plasma y orina en muchos estados patológicos podrían proveer un marcador bioquímico no invasivo para la actividad de enfermedades existentes, de respuesta a terapias o para demostrar la eficiencia de drogas (Nishioka, 1996).

La determinación de PAs unidas a proteínas en plasma podría convertirse en una herramienta útil para la diagnosis inicial de la presencia de un tumor y del seguimiento de pacientes con cáncer y/o bajo tratamiento. Lógicamente el compartimiento de proteínas correspondería a los aspectos cualitativos del cáncer, y al contrario, el conjunto de PAs en las células rojas sanguíneas (CRS) es más bien un reflejo de la proliferación. El nivel de PAs CRS es un indicador del estado de hiperplasia del tumor: regularmente los animales con tumores implantados muestran un incremento del contenido de PAs CRS; en estos modelos animales el nivel de Spd CRS no solo está relacionado con la progresión del tumor sino también con el contenido de PAs del tejido en proliferación.

Las PAs circulantes se han repetidamente propuesto como “marcadores” de proliferación celular. Como es demostrado por la eliminación de PAs en animales con tumores, las PAs extracelulares participan en el estado de la proliferación maligna; de hecho, juegan un papel importante en el descontrol del crecimiento celular. Por lo tanto, las PAs circulantes tienen características similares a aquellas observadas para las PAs intracelulares; las células en proliferación contienen cantidades incrementadas de PAs, sus concentraciones varían como una función del ciclo celular. Estas moléculas son elementos vitales para la célula. En un contexto clínico, respecto a la terapia se debe considerar el metabolismo de las PAs en toda su extensión, a nivel del organismo completo, y no solo en sus aspectos intracelulares (Nishioka, 1996).

Poliaminas y Cáncer

El cáncer representa una serie de enfermedades que afectan a un amplio rango de células y tejidos (Klug, 1999) con complejos factores etiológicos, así como múltiples aspectos que participan en su proliferación y diversas complicaciones (Villason, 1995). Las mutaciones que alteran el genoma o la expresión génica son un rasgo común de todos los cánceres (Klug, 1999). Así pues, la carcinogénesis involucra errores sustanciales en la replicación, déficit en la reparación del DNA y alteraciones en la segregación cromosomal (Loeb, 2001).

El desarrollo de un cáncer ocurre en etapas, la primera o de “iniciación”, se piensa que involucra algún tipo de daño genético a un cromosoma determinado. Este daño puede ser inducido por radiación, agentes químicos o por infección viral.

La segunda etapa es la “promoción”, en la cual se compromete a la célula a ser cancerosa. La tercer etapa es la “progresión”, aquí las células cancerosas se multiplican y desarrollan cambios mutantes adicionales lo cual facilita la sobrevivencia de las células cancerosas y tumores. Algunos de estos cambios pueden incrementar la invasividad (metástasis), permitiendo el desarrollo tumoral y alcanzando tejidos distantes a aquel en el que se originó, haciendo difícil la cirugía y atentando contra la vida del individuo (Cohen, 1998).

Las PAs juegan un papel importante en el crecimiento neoplásico y normal de las células. La inhibición de la síntesis de PAs con químicos como la difluorometilornitina (DFMO) por ejemplo conduce a una disminución del crecimiento del tumor con poco o ningún efecto tóxico en los tejidos normales. Esto es debido al patrón de crecimiento sin control, incluso en tumores lo cual es diferente del crecimiento lento de una célula normal junto con una desigualdad de necesidades de PAs. La relación de la síntesis realizada por las PAs

durante el NPT (nutrición parenteral total) es más compleja. Los primeros resultados muestran que el incremento de NPT durante el crecimiento del tumor depende de un incremento en el contenido de arginina tanto como la presencia de PAs. Esto sugiere que la arginina es un aminoácido limitante para la síntesis de PAs u otros papeles de la arginina aun están bajo en investigación.

El requerimiento de PAs en el crecimiento celular es algo ya definido. Ha sido bien establecido que el incremento de la síntesis de PAs está asociado con un crecimiento rápido de tejidos en condiciones normales así como humoral, tales como los tumores. Además, el contenido de PAs en orina, plasma y/o eritrocitos (CRSs) es considerado como un indicador de la proliferación tumoral en pacientes con cáncer. Aunque las concentraciones de PAs tanto en plasma como en CRSs fueron altas en pacientes con cáncer, las concentraciones en CRS fueron mucho mayores que las del plasma (Nishioka, 1996).

Si la asociación de un alto contenido de PAs en CRS con proliferación celular tumoral sugirió que esto podría ser útil como un marcador para detectar los cambios en la proliferación celular tumoral durante la NPT (Quemener, 1994. Tomado de Nishioka).

Cuando las células están estimuladas para la división celular se han demostrado incrementos en niveles y actividad de las enzimas biosintéticas involucradas en la síntesis de Pas, así como elevaciones en los niveles de PAs. Cabe mencionar que las concentraciones de PAs en fluidos extracelulares reflejan los eventos intracelulares y podrían ser útiles como indicadores inmediatos de terapias en enfermedades relacionadas con desordenes del ciclo celular incluyendo cáncer; el cual involucra el crecimiento celular alterado. El monitoreo diario de los niveles de PAs en plasma y orina en muchos estados patológicos podrían principalmente; proveer un marcador bioquímico no invasivo para el desarrollo y seguimiento de enfermedades existentes, en respuesta a terapias o para demostrar la eficiencia de drogas.

Las técnicas analíticas más complejas son útiles para aislar, identificar y cuantificar PAs. La mayoría de los métodos requieren un procedimiento de extracción para retirar los derivados de aminoácidos que interfieren. La cromatografía líquida de intercambio iónico y la de alta resolución (HPLC) automatizadas, con derivatización pre y post de la columna y la detección por fluorescencia o electroquímica son frecuentemente utilizadas para la cuantificación simultánea de cantidades picomolares de PAs (Khuawar, 2001). Los estudios que utilizan a ratones transgénicos que sobre expresan las enzimas biosintéticas de PAs, apoyan un papel de las mismas en la carcinogénesis (Pegg, *et al.* 2003).

Cromatografía en columna

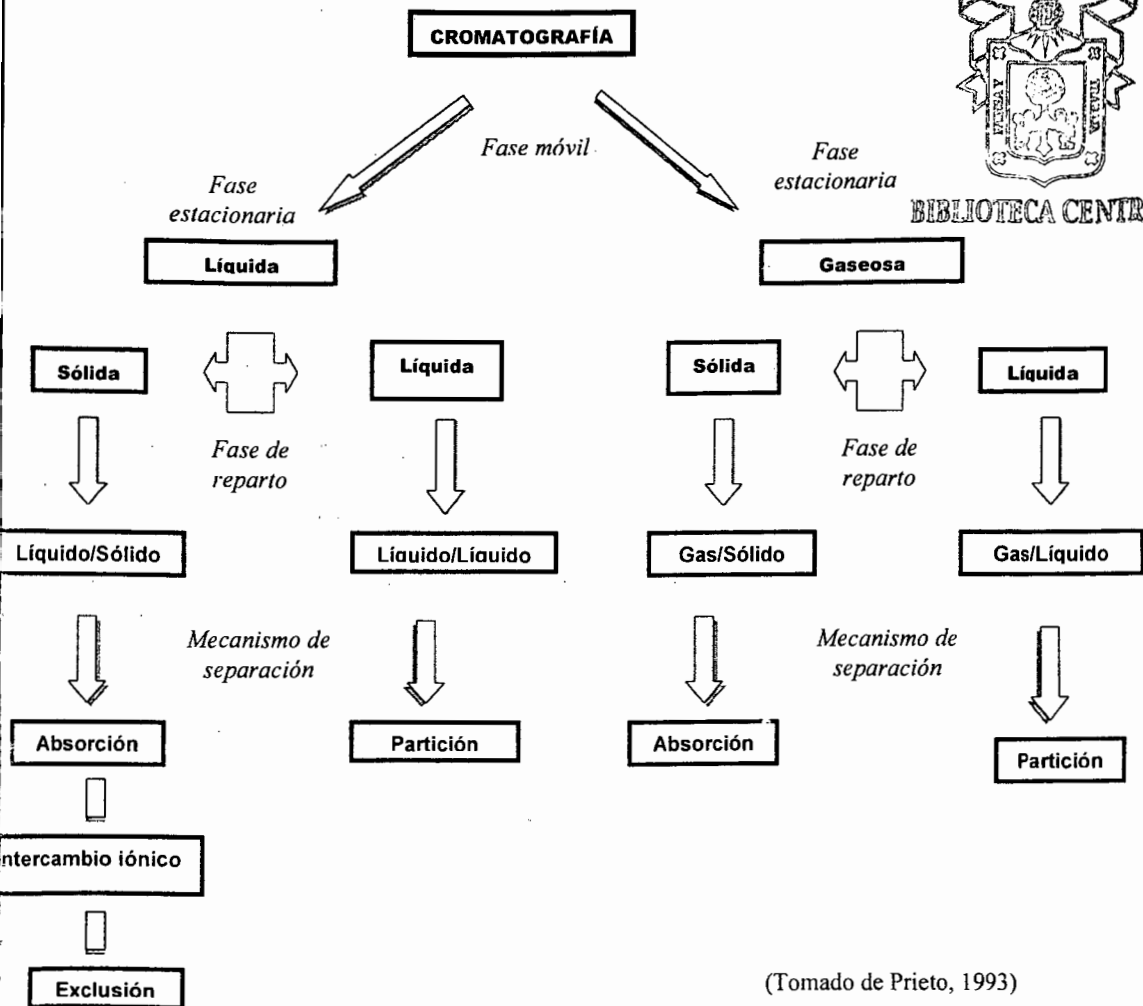
La cromatografía puede definirse como una herramienta para la separación de los componentes de una mezcla por medio de su distribución entre dos fases que son inmiscibles. La cromatografía actualmente se divide en tres grandes ramas; la gaseosa, la líquida y la supercrítica, que a su vez, se subdivide, dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria y del mecanismo de separación (Katime, 1998).

La cromatografía en columna es una técnica que se emplea en el fraccionamiento de sustancias. Consiste en la aplicación de una muestra compleja de sustancias a una columna o tubo de cristal en la que se ha situado una matriz sólida porosa o resina que está inmersa en un solvente. A continuación se bombea solvente a través de la columna. Las diferentes sustancias se van retrasando de manera distinta según sus interacciones con la matriz, por lo que pueden ser ya separadas diferencialmente a medida que son eluidas por el fondo de la columna. Según la matriz escogida, las sustancias se pueden separar de acuerdo a su carga, hidrofobicidad, tamaño y capacidad de unirse a grupos químicos particulares. De tal forma, se han desarrollado distintas estrategias para lograr una separación adecuada y el siguiente cuadro relaciona a las características físico-químicas ya mencionadas con el tipo de cromatografía utilizada (www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm)

Cuadro III. Clasificación de las técnicas cromatográficas



BIBLIOTECA CENTRAL



Los términos utilizados comúnmente en cromatografía son los siguientes:

- **matriz de la columna.** Sustancia que está bañada de solvente y que se empaca en la columna. También se denomina el lecho de la columna o fase sólida.
- **longitud de la columna.** Longitud del dispositivo en el que se empaca la columna.
- **volumen de la columna.** Volumen total de gel o resina que se empaca en una columna cromatográfica.
- **volumen muerto de la columna.** Cantidad de solvente que tiene que atravesar la columna para asegurar que se ha reemplazado completamente. Coincide con el volumen de solvente que sale de la columna desde que se aplica la muestra hasta que empieza a salir la primer sustancia o analito. En general, y dependiendo del tipo de cromatografía puede ser de una a varias veces el volumen de la columna.

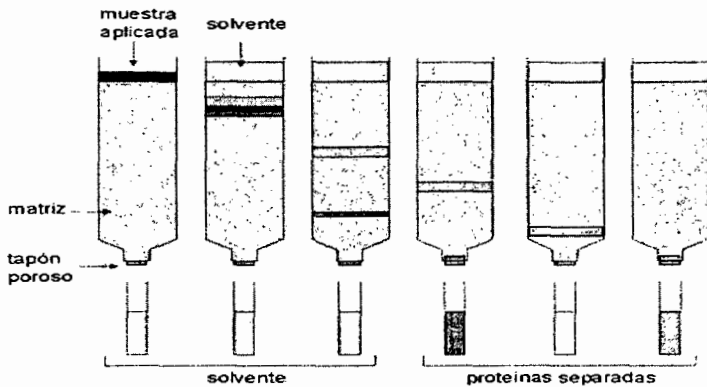


Figura2. Esquema de proceso de separación proteica en columna

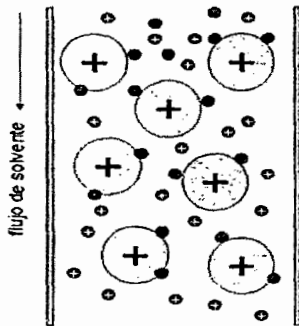
(www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm)

Todos los tipos de cromatografía en columna utilizan el principio de la cromatografía es la aplicación de una fuerza de separación a las sustancias o analitos que se desplazan a lo largo de una matriz sólida porosa. Este criterio de separación se basa en alguna propiedad que es diferentes entre las sustancias que se quieren separar y que se encuentran en mezclas en una muestra: peso molecular, carga eléctrica, afinidad de una de ellas por alguna otra. etc. (<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm>)

Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se realiza sobre matrices que tienen una carga neta (positiva en el esquema). La carga de la matriz de la columna así como la carga de las sustancias dependerá del pH del solvente y de su fuerza iónica (proporcional a la concentración de iones). En condiciones determinadas serán retenidas en la columna las moléculas que tengan una carga complementaria a la de la matriz del gel (las moléculas cargadas negativamente serán retenidas por una matriz cargada positivamente), siendo eluidas las restantes. Para selectivamente eluir las moléculas retenidas o de interés se puede variar la carga iónica del solvente o su pH de forma que se alcance el punto isoelectrico de la molécula de interés o el de la matriz, neutralizando de este modo la fuerza que retiene a las moléculas en resina. (<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm>)

La separación en este tipo de cromatografía se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los centros activos de una resina intercambiadora de iones, que actúa como fase estacionaria. En este tipo la fase estacionaria está cargada iónicamente y con una carga contraria a la del soluto. Se puede variar la fuerza iónica o del pH de la fase móvil con el fin de obtener mejores separaciones. Esta técnica se emplea casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. En general, cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica, lo que se traducirá en un tiempo de residencia mayor. Para controlar el tiempo de permanencia de la muestra en la columna se suele utilizar tanto el pH de la fase móvil como su polaridad (Katime, 1998).



Las partículas cargadas negativamente se unen a la matriz sólida cargada positivamente, y son retenidas.

Las partículas cargadas positivamente son rechazadas por la matriz sólida cargada positivamente y son eluidas.

La elución de las partículas cargadas negativamente se consigue cambiando el pH del solvente hasta igualarlo a su punto isoelectrico o hasta invertir su carga neta.

Figura 3. Principio de la cromatografía de intercambio iónico (www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm)

La distribución de las principales PAs: Pu, Spd y Spm se altera, al incrementarse su concentración en tejidos que crecen rápidamente. Este fenómeno ha provocado múltiples estudios en estados de salud y enfermedad. La medición simultánea a nivel picomolar de las PAs individuales en fluidos extracelulares o en los tejidos, es común en trabajos publicados actualmente (Weiss *et al.*, 2002). Las concentraciones elevadas de PAs en el fluido extracelular son indicadores inmediatos de las terapias en padecimientos que involucran el crecimiento celular y pérdida de los componentes celulares. El monitoreo diario de los niveles de PAs en orina o plasma indica la existencia de la enfermedad si se aplica una terapia (Jeevanandam y Petersen, 2001). Particularmente en el cáncer, monitorear la concentración de PAs en orina, suero o tejidos afectados a tiempos regulares de los pacientes podría tener significancia clínica en la predicción terapéutica o indicadora del transcurso del tumor. Además, en lo que respecta a las técnicas de separación cromatográfica, se sabe que la derivatización postcolumna presenta ventajas, sobre todo en la sensibilidad con respecto a la derivatización precolumna (Kuhawar y Qureshi, 2001).

III. JUSTIFICACIÓN

Las PAs son moléculas intracelulares importantes para la proliferación de células normales y cancerosas, por lo cual han sido muy estudiadas para el diagnóstico y el seguimiento de tumores antes y después del tratamiento. El uso de inhibidores de sus enzimas en trabajos de quimio prevención requiere del seguimiento de los niveles de PAs en los diferentes tejidos durante la evolución del cáncer. El linfoma murino L5178Y, el cual es un tumor tímico, que en 1958 se obtuvo en el laboratorio del Dr. Fisher de un ratón DBA/2. El modelo de linfoma murino L5178Y es muy útil para estudiar a la respuesta inmune y a los niveles de PAs. Sin embargo a la fecha se desconoce la concentración de PAs en fluidos corporales, células normales y cancerosas durante el desarrollo del tumor. Contar con esta información básica permitiría, probar la actividad potencial de fármacos naturales y sintéticos contra el desarrollo del cáncer, utilizando a las PAs como bioindicadores del crecimiento neoplásico en órganos, tejidos y fluidos.

El incremento de la información básica en la disciplina de las PAs puede atraer a clínicos considerándolo a las PAs, sus metabolitos y antimetabolitos como objetivos de un tratamiento efectivo.

IV. HIPÓTESIS

Los niveles altos de poliaminas putrescina, espermidina y espermina en ratones con linfoma L5178Y en distintos tejidos, estirpes celulares, células cancerosas y fluidos corporales son bioindicadores del desarrollo neoplásico.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la concentración de poliaminas en células del sistema inmune, fluidos corporales y células cancerosas de ratones con linfoma L5178Y.

Objetivos particulares

1. Determinar la concentración de putrescina, espermidina y espermina a los 10, 17 y 24 días de crecimiento tumoral en: 1) Células peritoneales, esplenocitos y leucocitos circulantes, 2) Mesotelio peritoneal e hígado y 3) Líquido de ascitis, plasma y orina de ratones BALB/c inoculados con linfoma L5178Y.
2. Asociar los niveles de poliaminas y el crecimiento del tumor en este modelo.

VI. METODOLOGÍA

Material biológico:

Grupos de Estudio

Se utilizaron grupos de 5 ratones singénicos BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad, alojados por grupo dentro de jaulas de policarbonato. Los animales se mantuvieron en habitaciones con temperatura controlada de 22 °C y ciclos alternos de iluminación-oscuridad de 12 h, alimentados con una dieta balanceada especial para roedores y agua purificada para consumo voluntario.

Se formaron grupos de 5 ratones para cada grupo: 1 de sanos y 3 con tumor. A ratones con tumor se inocularon con 2×10^4 células L5178Y por vía i.p. y se sacrificaron en grupos al los días 10, 17 y 24 de crecimiento tumoral.

Preparación y obtención de muestras biológicas

CELULAS:

Obtención del contenido peritoneal

El sacrificio de todos los ratones se realizó en cámara de éter, se lavó el peritoneo con 0.5 ml de solución balanceada de Hanks (HBSS), la suspensión celular se centrifugó a 2,500 rpm; el sobrenadante se retiró para la cuantificación de poliaminas y el botón celular se lavó dos veces con HBSS. Se obtuvieron 2×10^4 células y se absorbió el sobrenadante con un aplicador de algodón. Las células se resuspendieron en una solución de ácido tricloroacético 5N-ácido clorhídrico 0.05% (ATA-HCl) y se lisaron mecánicamente, se centrifugaron 10,000 rpm 20' y del sobrenadante se inyectaron 80 µl con 20 µl de solución del estándar interno (1,7 Díaminoheptano) para su análisis cromatográfico.

Esplenocitos

A cada ratón se le practicó esplenectomía. Se disgregaron las células del bazo en HBSS y la suspensión se centrifugó a 2,500 rpm por 5', se obtuvieron 1×10^6 células y el sobrenadante se absorbió con un aplicador de algodón, se lisaron las células en ATA-HCl con homogeneizador, se centrifugaron a 10,000 rpm por 20' y se almacenaron a -80 °C. Del sobrenadante se tomaron 80 µl para su análisis cromatográfico con 20 µl de solución del estándar interno (1,7 Díaminoheptano). Los resultados se expresan como concentración en nmoles de PAs por 5×10^5 células.

Leucocitos circulantes

Media hora antes del sacrificio, se inyectó a los ratones una solución de heparina por vía (sc) y después del sacrificio se obtuvo la sangre por punción cardiaca, se centrifugó a 2,500 rpm por 5' para separar el plasma del paquete celular por gradiente de densidad por la técnica de Boyüm. Se ajustó las células a un millón en tubo ependorff. Se centrifugaron a 1,500 rpm por 5' y el sobrenadante se absorbió con un aplicador de algodón. Las células se lisaron mecánicamente y se mezclaron con 100 µl de la solución de ATA-HCl. La suspensión se centrifugó a 10,000 rpm por 20' y del sobrenadante se tomo 80 µl que corresponden a 5×10^5 células y se inyectó al equipo cromatográfico.

TEJIDOS:

Mesotélio peritoneal

Fragmentos de tejido mesotelial del peritoneo, se ajustaron a 1mg de tejido/µl de ATA-HCl. se lisaron las células con homogeneizador y se centrifugaron por 20' a 10,000 rpm y se congelo el sobrenadante a -80°C .

Hígado

Por hepatectomía se obtuvo el hígado, se lavó con solución balanceada de Hank y se corto una porción del lobulo anterior de cada ratón. Se peso y diluyo con 4 µl de ATA-HCl por mg de tejido, se homogeneizó (con homogenizador) y se centrifugó a 10,000 rpm por 20', el sobrenadante se congelo a -80°C y se tomaron 80 µl que se mezclaron con 20 µl del estándar interno (1,7 Díaminoheptano) para su análisis cromatográfico. Los resultados se expresan como concentración en nmoles de PAs por mg de tejido.

FLUIDOS:

Líquido de Ascitis

El lavado peritoneal se realizo sólo en aquellos grupos en que el contenido del peritoneo era insuficiente (10 días), en el resto de los grupos se obtuvo el líquido de ascitis después de centrifugar a 2,500 rpm durante 5'. Se mezclo con una solución de ATA-HCL, se centrifugo a 10,000 rpm por 20' y se congelo a -80°C para inyectar 80 µl con 20 µl de solución del estándar interno (1,7 Díaminoheptano) para su análisis cromatográfico. Los resultados se expresan en nmoles de PAs por µl de líquido de ascitis.

Plasma

Se obtuvo la sangre por punción cardiaca, se centrifugó a 2,500 rpm y se acidificó con ATA-HCl para centrifugarla a 10,000 rpm por 20'. Se obtuvo el sobrenadante para ultracongelarlo a -80 °C hasta ser sometido a análisis cromatográfico.

Orina





















Se colocó a los ratones de manera individual sobre cajas de petri de 15 cm de diámetro, se obtuvo la orina y se paso con pipeta pasteur a un tubo ependorff, se ajusto a 70 µl ATA-HCL por cada 10 µl de orina, se centrifugó a 10,000 rpm, por 20' y se congeló a -80 °C.

Parámetros cromatográficos

Se utilizó un analizador automático con dos bombas de flujo continuo y controlado, con fluorometro (Shimatzu) y muestreador automático con "bucle" de 100 µl de volumen (Spectra Physics), en el cual se analizaron, por duplicado, todas las muestras biológicas.

Los amortiguadores se preparan con agua filtrada tipo III, bidestilada. Son llevados al pH deseado con HCl concentrado o con una solución de hidróxido de litio 3M y filtrada en membrana MILLIPORE (0.45 µm). El etanol es añadido después de la filtración.

Cuadro IV. Ciclo programado al sistema cromatográfico

Línea	Tiempo (Minutos)	Amortiguador I	Amortiguador II	Reactivo derivatizante (OPA*)	LiOH
00	10				
01	10				
02	20				
03	50				
04	11				

* o-phthalaldehydo

El reactivo de fluorescencia se prepara al disolver 800 mg de ortoftaldehído en 10ml de etanol y 2 ml de mercaptoetanol. La mezcla se lleva a un litro de una solución de ácido bórico 0.2 M y un pH de 10.4 con KOH y se le adiciona 3 ml de Brij al 30%.

En nuestras condiciones el primer amortiguador eluye los aminoácidos ornitina y arginina. El segundo amortiguador eluye, la putrescina, la espermidina, la espermina, así como el estándar interno el 1-7 diaminoheptano.

Niveles de Poliaminas

La separación de las poliaminas se realizó según la técnica descrita por Villanueva, 1987 con las modificaciones siguientes: Se modificó el pH de la segunda solución de eluan (solución II) a base de citratos ($C_6H_5Li_3O_7$ 0.6 N + KCl 2 N) con 5.5% etanol y pH final de 6.1 se inyectó durante 60', eluye la putrescina, espermidina y espermina; se lavó durante 11' con una solución de LiOH 0.3 N para reutilizar la columna en un nuevo análisis. La columna se reequilibró con el paso de solución I durante 10'. Los resultados se expresan por concentración en nanomoles de poliaminas por mg de tejido o por μ L de orina según sea el caso.

Análisis Estadístico

Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía, para medir las diferencias estadísticas entre grupos y el método de Student-Newman-Keuls, para determinar las diferencias entre las medias de los distintos grupos.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

El presente trabajo tiene como objetivo confirmar la utilidad de las PAs como bioindicadores del desarrollo tumoral en el modelo murino L5178Y, el cual es muy utilizado en estudios inmunológicos; en particular para probar, *in vivo*, la actividad antitumoral de sustancias de origen natural y sintético. Los resultados obtenidos en este trabajo son presentados a manera de gráficas en esta sección.

Sobrevida

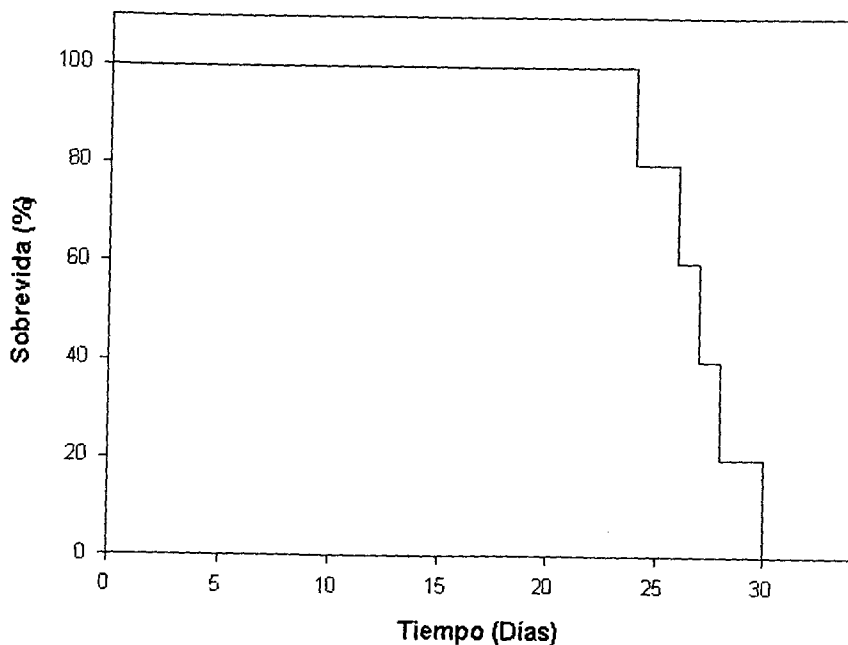


Figura 4. Porcentaje de supervivencia de ratones inoculados con 2×10^4 células L5178Y por vía i.p.

A continuación nosotros reportamos únicamente los resultados analíticos con significancia estadística en los niveles de PAs.

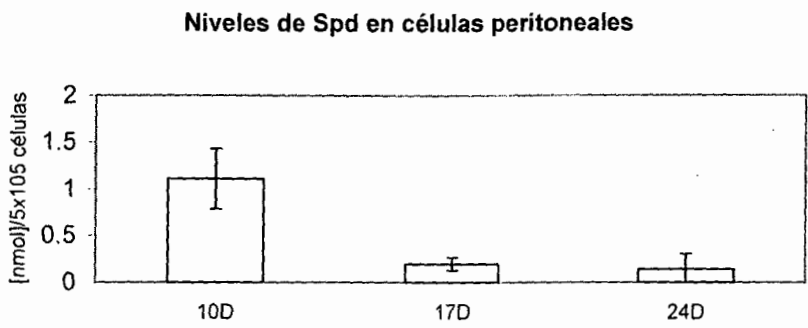


Figura 5. Niveles de espermidina en 5×10^4 células del peritoneo de ratones inoculados con 2×10^4 células L5178Y, durante la evolución del tumor. El análisis estadístico se realizó por análisis de varianza (ANOVA) de una vía para diferencias entre grupos y la prueba de Student-Newman-Keuls para comparación de medias ($p < 0.05$).

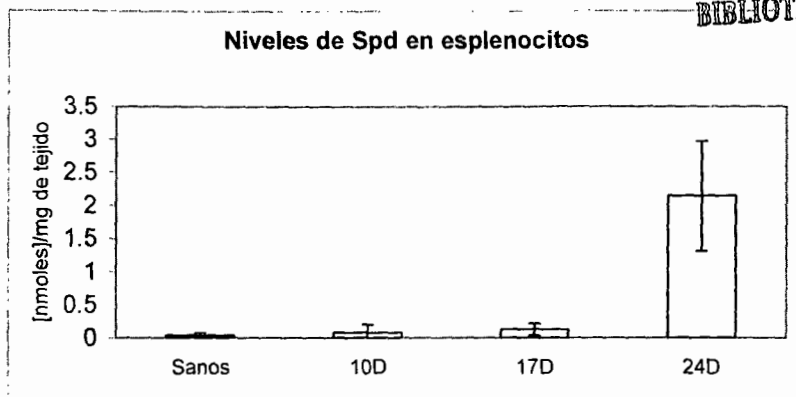


Figura 6. Niveles de espermidina en 5×10^4 células del bazo de ratones inoculados con 2×10^4 células L5178Y, durante la evolución del tumor. El análisis estadístico se realizó por análisis de varianza (ANOVA) de una vía para diferencias entre grupos y la prueba de Student-Newman-Keuls para comparación de medias ($p < 0.05$).

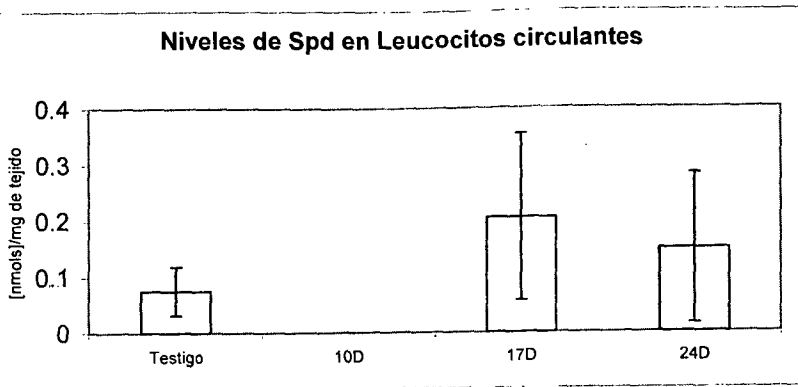


Figura 7. Niveles de espermidina en 5×10^4 en leucocitos circulantes en ratones inoculados con 2×10^4 células L5178Y, durante la evolución del tumor. El análisis estadístico se realizó por análisis de varianza (ANOVA) de una vía para diferencias entre grupos y la prueba de Student-Newman-Keuls para comparación de medias ($p < 0.05$).

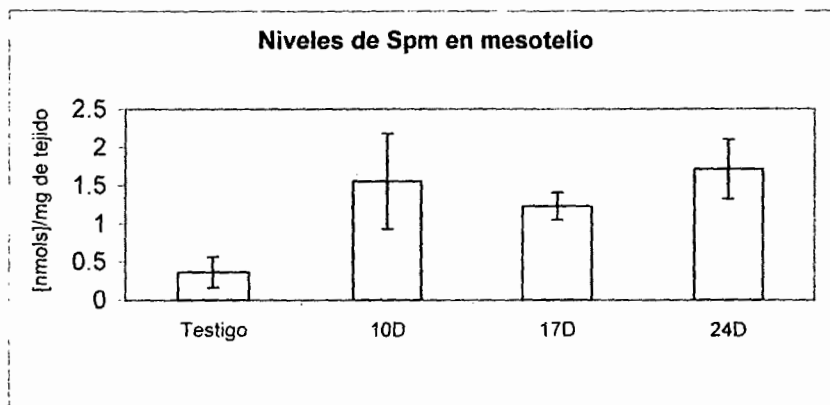


Figura 8. Niveles de espermina en el mesotelio de ratones inoculados con 2×10^4 células L5178Y, durante la evolución del tumor. El análisis estadístico se realizó por análisis de varianza (ANOVA) de una vía para diferencias entre grupos y la prueba de Student-Newman-Keuls para comparación de medias ($p < 0.05$).

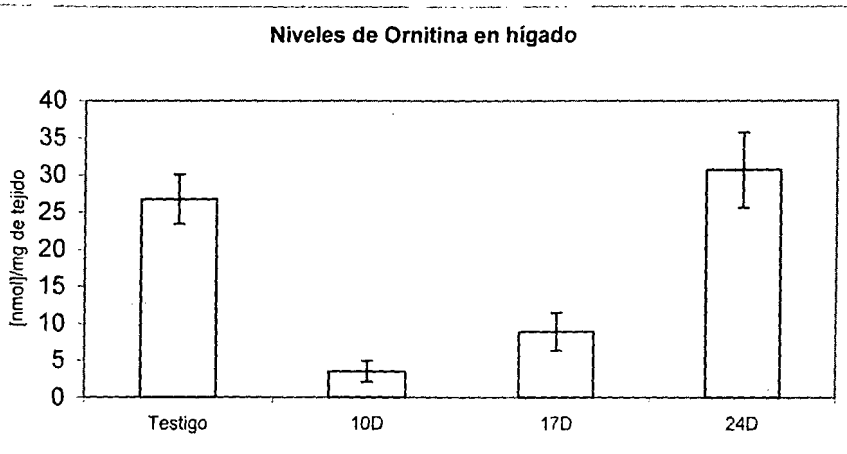


Figura 9. Niveles de ornitina en el hígado de ratones inoculados con 2×10^4 células L5178Y, durante la evolución del tumor. El análisis estadístico se realizó por análisis de varianza (ANOVA) de una vía para diferencias entre grupos y la prueba de Student-Newman-Keuls para comparación de medias ($p < 0.05$).

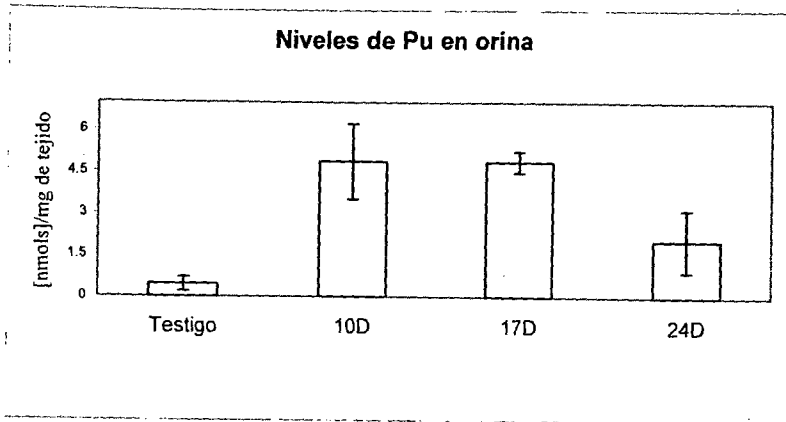


Figura 10. Niveles de putrescina en orina de ratones inoculados con 2×10^4 células L5178Y, durante la evolución del tumor. El análisis estadístico se realizó por análisis de varianza (ANOVA) de una vía para diferencias entre grupos y la prueba de Student-Newman-Keuls para comparación de medias ($p < 0.05$).

Porcentaje de sobrevida

Para probar la actividad antitumoral de sustancias necesitabamos una sobrevida más larga que sea más parecida a la patología, por lo cual se inocularon solamente 2×10^4 células del linfoma.

El tiempo de sobrevida que se midió confirma resultados anteriores (comunicación personal de la Dra. Ana Maria Puebla), tomando en cuenta la curva de sobrevida consideramos apropiado realizar los muestreos a los días 10 donde los ratones parecen normales; 17 donde se aprecia un abdomen prominente y 24 donde el ratón enfermo muestra un crecimiento considerable del abdomen.

Establecer el promedio de vida de los ratones inoculados con 2×10^4 células del linfoma L5178Y por vía intraperitoneal fue importante para fines de reproducibilidad, dado que confirmamos un promedio de vida de 28 días (± 2.5) en este modelo (Puebla, 1998); por otro lado fue importante para establecer el momento adecuado para la obtención de las muestras que van a ser analizadas por cromatografía. Así se estableció muestrear a los 10, 17 y 24 del desarrollo del tumor (Figura 1).

Células peritoneales

En el peritoneo después de la inoculación de células tumorales, se espera encontrar distintas estirpes celulares en particular células del sistema inmune junto con células tumorales. Por lo tanto los niveles de PAs detectados para las células peritoneales corresponden al contenido global de estas moléculas. Fue posible medir a los niveles de PAs en los ratones que presentaban el tumor y crecimiento de la cavidad. Los resultados sugieren que la espermidina es un buen biomarcador si se analiza al día 10 de la evolución del L5178Y ya que sus niveles se incrementan en comparación con los días 17 y 24 (Figura 2).

Esplenocitos

El bazo es un órgano inmunológico importante por lo cual resulta interesante, estudiar los niveles de PAs en las células que lo conforman dada la lucha entre las células del sistema inmune y las células del tumor que se ha inoculado, lo cual se puede reflejar en cambios de los niveles de PAs. En los ratones con tumor, a pesar de que los esplenocitos mantienen sus niveles basales de Spd a los días 10 y 17, estos niveles se aumentan al día 24. Sin embargo,

la Spd en esplenocitos no es un buen biomarcador del crecimiento neoplásico dado que los ratones están en la fase terminal de la enfermedad (Figura 3).

Leucocitos circulantes

Estas células, que también son conocidas como células mononucleares, son fundamentales para una buena respuesta inmune; en nuestras condiciones no fue posible detectar a la Spd al día 10. Sin embargo, existe una elevación importante al día 17 y un poco mas discreta al día 24. Al parecer al día 10 la ausencia de Spd se asocia con una inhibición en la proliferación de los leucocitos circulantes, lo que se asocia con el efecto inmunosupresor ejercido por este linfoma (Ochoa, *et al.* 2002; Schemeda, *et al.* 2001; Orozco, *et al.* 1999; Daneri, *et al.* 1995 y). Por otro lado si tomamos al presente modelo como un mecanismo para injertar a las células tumorales esta bien establecido que la inhibición de la síntesis de PAs disminuye el rechazo al trasplante, lo que en nuestro caso parece ser inducido por el tumor mismo, solo al día 10 de nuestro modelo (Figura 4).

Mesotelio

Este falso epitelio (ya que es un tejido epitelial derivado del mesodermo y no del ectodermo como sucede con todos epitelios) tejido mesotelial es importante en este modelo y en la medición de las moléculas de nuestro interés dado que es un tejido que se encuentra en contacto directo con las células del linfoma. Es interesante por demás, que la Spm es la PA mas representativa de la evolución del tumor en este tejido dado que sus niveles aumentan de manera considerable en los tres puntos de referencia tomados en este estudio (Figura 5).

Hígado

Las PAs no parecen ser buenos biomarcadores del desarrollo neoplásico en este órgano. Sin embargo, el aminoácido secundario ornitina si permite monitorearlo con respecto a la evolución del linfoma L5178Y; a los días 10 y 17 existe una disminución importante de sus niveles; por lo cual la ornitina es un bioindicador en este tejido (Figura 6).

Orina

Consideramos que esta es la muestra biológica idónea para determinar a las PAs como bioindicadores del desarrollo neoplásico dado que su obtención representa una estrategia

no invasiva. Es todavía mas interesante que con un método de extracción tan sencillo como el que aplicamos (acidificación con TCA-HCl y centrifugación) es posible utilizar a la putrescina como biomarcador del desarrollo tumoral en el modelo de linfoma murino L5178Y. El hecho de que los niveles de putrescina aumenten hasta 5 veces (día 10) con respecto a los niveles basales hace a la putrescina el mejor indicador de todos los parámetros considerados en el presente estudio (Figura 7).

Es importante mencionar que existieron muestras biológicas a las que no fue posible detectar PAs en nuestras condiciones analíticas tomando en cuenta el método de extracción y el nivel de detección.

Desde el punto de vista de los parámetros estadísticos queremos señalar que aquí se encuentran registrados solo aquellos datos que son significativos cuando se someten al rigor de las pruebas estadísticas mencionadas en material y métodos.

VIII. CONCLUSIONES

1. El tiempo de sobrevida de los ratones BALB/c inoculados con 2×10^4 células de linfoma L5178Y por vía i.p. es de 28 días \pm 2.5.
2. Las concentraciones de PA son útiles como biomarcadores del desarrollo neoplásico en los tejidos de estudio y a los días correspondientes se expresan en la siguiente tabla:

Tejido/PA	Ornitina	Putrescina	Espermidina	Espermina	Día de toma de muestra
Orina		0.45 \pm 0.2			Basal
		4.86 \pm 1.36			10
		4.85 \pm 0.37			17
		2.02 \pm 1.1			24
<i>Esplenocitos</i>			0.03 \pm 0.03		Basal
			0.07 \pm 0.12		10
			0.12 \pm 0.08		17
			2.14 \pm 0.82		24
<i>Celulas peritoneales</i>			No analizado		Basal
			0.03 \pm 0.03		10
			0.07 \pm 0.12		17
			0.12 \pm 0.08		24
<i>Higado</i>	26.76 \pm 3.32				Basal
	3.49 \pm 1.42				10
	8.90 \pm 2.55				17
	30.68 \pm 5.07				24
<i>Mesotelio</i>				0.36 \pm 0.20	Basal
				1.55 \pm 0.62	10
				1.22 \pm 0.17	17
				1.71 \pm 0.38	24

La tabla no presenta los valores de aquellas muestras a las que no fue posible determinar los niveles de PAs o que no se consideran útiles como biomarcadores.

3. Se destaca que los niveles de PAs varían durante el desarrollo del tumor. En hígado se observó que la ornitina, precursor de las PAs presenta un perfil de concentraciones particular y en orina la Pu es la más idónea como biomarcador del desarrollo neoplásico.

IX. PERSPECTIVAS

El presente trabajo contribuye de manera significativa en el desarrollo de un proyecto de investigación, el cual pretende utilizar a las PAs como herramienta y complementaria a estudios inmunológicos para determinar la cantidad antitumoral de varias sustancias de origen natural o sintético.

La siguiente tabla destaca la utilidad de varias PAs (Pu, Spm y Spd) o su precursor (Orn) como bioindicador del desarrollo del tumor, indicando la muestra considerable y el día apropiado de muestreo.

PA	Muestra	Orina	Peritoneales	Mononucleares	Esplenocitos	Hígado	Mesotelio
Evolución Tumoral: (Día)		10 / 17 / 24	10 / 17 / 24	10 / 17 / 24	10 / 17 / 24	10 / 17 / 24	10 / 17 / 24
Ornitina						* *	
Putrescina		* * *					
Espermidina			* *	* *	*		* * *
Espermina							* * *

Obviamente la determinación de PAs es la mas fácil, recomendable y menos invasivo de todos los anteriores.

X. LITERATURA CITADA

- Azcon-Bieto, J. y Talón, M. 2000.
- Babbar, N. y Gerner, E. W. 2003. Polyamines as modifiers of genetic risk factors in human intestinal cancers. *Biochem Soc. Trans.* 31(2): 388-392.
- Becker, J. C.; Nikroo, A.; Brabletz, T. y Reisfeld R. A. 1995. DNA loops induced by cooperative binding of transcriptional activator proteins and preinitiation complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 9727-9731.
- Behe, M. y Felsenfeld G. 1981. Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: the B to Z transition in poly (dG-m⁵dC)*poly(dG-m5dC). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 1619-1623.
- Boyüm A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of cells by one centrifugation and granulocyte by combining centrifugation and sedimentation. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 97(21 Suppl.): 77-89.
- Cohen, S. S.. 1998. A Guide to the polyamines, Oxford University, New York.
- Danneri NA, Del Toro AA, Garcia VJC, Del Toro AS, Orbach AS, Bravo CA. 1995. L5178Y lymphoma associated immunosuppression in Balb/c mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 49, 39-44.
- Egli, M.; Williams L. D.; Gao Q. y Rich A. 1991. Structure of the pure-spermine form of Z-DNA (magnesium free) at 1-Å resolution. *Biochem.* 30: 11388-11402.
- Feuerstein, B. G.; Pattabiraman N. y Marton L. J. 1989. Molecular dynamics of spermine-DNA interactions sequence specificity and DNA bending for a simple ligand. *Nucleic Acids Res.* 17: 6883-6892.
- Feuerstein, B. G.; Pattabiraman, N. y Marton L. J. 1986. Spermine-DNA interactions: a theoretical study. *Proc Natl Acad. Sci. USA.* 83: 5948-5952.
- Fischer, S. M.; Conti, C. J.; Viner, J.; Aldaz, C. M. y Lubet, R A. 2003. Celecoxib and difluoromethylornithine in combination have strong therapeutic activity against UV-induced skin tumors in mice. *Carcinogenesis* 24 (5): 945-952.
- Gallardo, M.; Matilla, A.; Muñoz de Rueda, P. y Sánchez Calle I. M. 1996. *Ars Pharm* 37(1):17-27.
- Gupta, S. 1999. Prostate cancer chemoprevention by green tea: in vitro and in vivo inhibition of testosterone-mediated induction of ornithine decarboxylase. *Can. Res.* 59 (9): 2115-2120.

- Herbert, A. y Rich, A. 1999. Left-handed Z-DNA: structure and function. *Genetica*. 106: 37-47.
- Hougaard, D. M.; Bolund, L.; Fujiwara, K. y Larsson L. I. 1987. Endogenous polyamines are intimately associated with highly condensed chromatin in vivo. A fluorescence cytochemical and immunocytochemical study of spermine and spermidine during the cell cycle and in reactivated nuclei. *Eur J. Cell Biol.* 44: 151-155.
- <http://www.ub.es/bioce1/wbc/tecnicas/cromatografia.htm>
- Hurta, R. A. R. 2000. Altered ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase expression and regulation in mouse fibroblasts transformed with oncogenes or constitutively active mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase. *Mol. and Cell. Biochem.* 215: 81-92.
- Jeevanandam, M.; y Petersen, S.R. 2001. Clinical role of polyamine analysis, problem and promise. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 4: 385-390.
- Katime, I.; Katime, O. y Katime, D. 1998. Cromatografía líquida: teoría y aplicaciones. Universidad de Guadalajara. pp 15-17.
- Khuhawar, M.Y. y Qureshi, G.A. 2001. Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *J. Chrom. B.* 764: 385-407.
- Klug W. S. y Cummings M., R. 1999. *Conceptos de Genética*, Quinta edición. Editorial Prentice Hall: 625-642.
- Kobayashi, M. 2003. Fate of orally administered ¹⁵N-labeled polyamines in rats bearing solid tumors. *Biol. Pharm. Bull.* 26(3): 285-288.
- Lan, L.; Trempus, C. y Gilmour, S. K. 2000. Inhibition of ornithine decarboxylase (ODC) decreases tumor vascularization and reverses spontaneous tumors in ODC/Ras transgenic mice. *Cancer Res.* 60: 5696-5703.
- Larsson, J. y Rasmuson-Lestander, A. 1997. Cloning, mapping mutational analysis of the S-adenosylmethionine decarboxylase gene in *Drosophila melanogaster*. *Mol & General Gents.* 256 (6): 652-660.
- Levin, V. A.; Uhm, J. H.; Jaeckle, K. A.; Choucair, A.; Flynn, P. J.; Yung, W. K. A.; Prados, M. D.; Bruner, J. M.; Chang, S. M.; Kyritsis, A. P.; Gleason, M. J. y Hess, K. R. 2000. Phase III randomized study of postradiotherapy chemotherapy with α -difluoromethylornithine-procarbazine, N-(2-Chloroethyl)-N'-cyclohexyl-N-

nitrosurea, vincristine (DFMO) *Versus* PCV for glioblastoma multiforme. *Clinical Cancer Research*. 6: 8378-3884.

- Loeb L. A. 2001.. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*. 61: 3230-3239.
- Meyskens, FL. Jr. y Gerner, E. W. 1999. Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. *Clin. Can. Res*. 5: 945-951.
- Morgan, D. L. 1998. Polyamine Protocols, Polyamine an introduction. Humana Press. pp 5.
- Moulinox, J-P.; Quemener, V.; Delcros, J. V. y Cipolla, B. 1996. Capitulo 10 Circulating polyamines as biological markers for cancer; en Nishioka, K. Polyamines in cancer: basic mechanisms and clinical approaches. Editorial Chapman and Hall. USA. pp 237-245.
- Murray, R. K. 1993. Bioquímica de Harper, 12ª edición, Manual moderno, México. pp 383-387.
- Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2001. 2; 188-194.
- Nishioka, K. ph. D. y D.M.Sc. 1996. Polyamines in cancer: Basic mechanisms and clinical approaches. Chapman and Hall. USA. pp 237-245.
- O'Shaughnessy, J. A.; Demers, L. M.; Jones, S. E.; Arseneau, J.; Khandelwal, P.; George, T.; Gersh, R.; Mauger, D. y Manni, A. 1999. α -Difluoromethylornithine as treatment for metastatic breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 5: 3438-3444.
- Ochoa, R. M. C.; Guadarrama, L. L. I. y Mendez, J. D. 2002. Papel de las poliaminas en la inmunosupresión. *Rev Med IMSS*. 40 (1): 77-83.
- Orozco-Barocio A, Zaitseva G., Chavez-AnaYa A., Arceta Gonzalez IV., Puebla Perez AM., Alfaro Bustamante F., Zimina IV., and Vitaly A. 1999. Modulation of immune response of BALB/c mice bearing lymphoma L5178Y treated with a bitter yellow Aloe vera (L) in vivo. *Russian Jof Immunol*. 4,44-50.
- Pegg, A. E.; Feith, D. J.; Fong, L. Y. Y; Coleman, C. S.; O'Brien, T. G. y Shantz, L. M. 2003. Transgenic mouse models for studies of the role of polyamines in normal, hypertrophic and neoplastic growth. *Biochem. Soc. Trans*. 31(2): 356-360.
- Porter, C. W.; Bernacki R. J.; Miller J. y Bergeron, R. J. 1993. *Cancer Res*. 53: 581-586.
- Prieto, S.; Amich, S. y Salve, M. L. 1993. Laboratorio clínico. Principios generales. Interamericana-MacGraw Hill, Madrid España. pp 9.

- Puebla-Pérez AM, Huacuja L., Rodríguez G., Lozoya X, Zaitseva-Petrovna G, Villaseñor-García MM. 1998. Cytotoxic and antitumor activity from *Bursera fagaroides* ethanol extract in mice with L5178Y lymphoma. *Phytotherapy Res.* 12: 545-548.
- Qu, N.; Ignatenko, N. A.; Yamauchi, P.; Stringer, D. E.; Levenson, C.; Shannon, P.; Perrin, S. y Germer, E. W. 2003. Stereospecific inhibition of human ornithine decarboxylase activity by enantiomers of Difluoromethylornithine. *Biochem. Journ.*
- Redman, C.; Xu, M. J.; Peng, Y. M.; Scott, J. A.; Payne, C.; Clark, L. C. y Nelson, M. A. 1997. Involvement of polyamines in selenomethionine induced apoptosis and mitotic alterations in human tumor cells. *Carcinogenesis.* 18(10): 1195-1202.
- Rich A. N. y Wang A. H. 1984. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA. *Rev. Biochem.* 53: 791-846.
- Russell; F. J.; Cole, C. E.; Tutsch, K.; Newton, M. A.; Kelloff, G.; Hawk, E. T. y Lubet, R. A. 2000. Chemopreventive efficacy of combined piroxicam and difluoromethylornithine treatment of apc mutant min mouse adenomas, and selective toxicity against apc mutant embryos. *Cancer Research.* 60: 1864-1870.
- Sauve, D. M.; Anderson, H. J.; Ray, J. M.; W. M., James y Roberge M. 1999. Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH₂-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J. Cell Biol.* 145: 225-235.
- Schmeda-Hirschmann G, Villaseñor-García MM, Lozoya X, and Puebla-Pérez AM. 2001. Immunomodulatory activity of Chilean *Cyttaria* species in mice with L5178Y lymphoma. *Journal of Ethnopharmacology.* 77, 253-257.
- T. J., Thomas y Messner, R. P. 1988. Structural specificity of polyamines in left-handed Z-DNA formation, Immunological and spectroscopic studies. *J. Mol. Biol.* 201: 463-467.
- Takahashi, Y.; MAI, M. y Nishioka, K. 2000. α -Difluoromethylornithine induces apoptosis as well as anti-angiogenesis in the inhibition of tumor growth and metastasis in a human gastric cancer model. *Int. J. Cancer.* 85: 243-247.
- Thomas, T. y Thomas, T. J. 2001. Polyamines in cell growth and cell death: mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 244-258.
- Villason A., S., F. Terrazas E., G. E. 1995. Carrera A. Panorama General de Nutrición y Cáncer. En: Ochoa, F., Robles-Grill, J. Apoyo Nutricio en Cáncer. México. Interamericana- McGraw-Hill: 1-11.

- Weiss, T.S.; Thasler, W. E.; Dolgner D.; y Jauch, K-W. 2002. Polyamine levels of human colorectal adenocarcinomas are correlated with tumor atage and grade. J. Colorectal Dis. 17: 381-387.