

396552742

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR



**“ESTANDARIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
DE LA ORNITINA DESCARBOXILASA EN TEJIDOS DE RATÓN”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

EDGAR OSWALDO ZAMORA GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. RAMÓN REYNOSO OROZCO

ASESORES

DR. ANNE SANTERRE

DR. ANA MARÍA PUEBLA PÉREZ

Las Agujas, Zapopan, Jal., Noviembre de 2006



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología*
844 / C. C. BIOLOGÍA

C. EDGAR OSWALDO ZAMORA GONZALEZ
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: "Estandarización y determinación de la actividad de la ornitina descarboxilasa en tejido de ratón" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: DR. RAMON REYNOSO OROZCO y el Asesor/a es el/la: DRA. ANNE SANTERRE LUCAS y la/el: DRA. ANA MARIA PUEBLA PEREZ.

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 16 de Octubre del 2006.

"2006. Año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas.
Don Benito Juárez García"

DR. CARLOS ALVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

En C. ISELA ALVAREZ BARAJAS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

BIBLIOTECA CUCBA

Dr. Carlos Álvarez Moya.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Carrera de Licenciado en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis e informe, opción tesis con el título: **"Estandarización y determinación de la actividad de la ornitina descarboxilasa en tejido de ratón"** que realizó el pasante **Edgar Oswaldo Zamora González** con número de código **396552742** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Las agujas, zapopan, Jalisco, 1 de noviembre del 2006



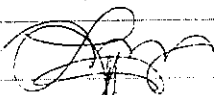

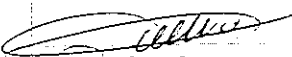

Firma
 Ramón Reynoso Orozco
 Director de Tesis



Firma
 Anne Santerre Lucas
 Ana Maria Puebla Pérez
 Asesoras



Handwritten notes:
 No Bo
 CUCBA
 6/10/06
 CUCBA

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Laura Gpe. Medina Cesa		01/11/06
Luzge Peregrina S		01/11/06
Adolfo Cauderes Outiga		01/11/06
Supl. Alberto Mosulón		01/11/06

La presente tesis fue dirigida por el Dr. Ramón Reynoso Orozco y como asesores la Dra. Anne Santerre L. y la Dra. Ana María Puebla Pérez 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.

La medición de la actividad de ODC se realizó en el laboratorio del Dr. Calvo-Méndez en el Instituto de Investigación en Biología Experimental (IIBE) en la Facultad de Química de la Universidad de Guanajuato.

AGRADECIMIENTOS

“No le evitéis a vuestros hijos las dificultades de la vida, enseñadles más bien a superarlas.”

“Louis Pasteur”

A mis padres (Alberto y Maria) por todo el apoyo y consejos que me han brindado a lo largo de mi vida, a mis hermanos (Alberto, Sujey, Marcela, Edith y Josué) por la ayuda que me brindan día con día.

A Berenice por todo el apoyo y ayuda incondicional que me brinda.

A mis maestros (Ramón, Anne, Ana, Calvo y Salvador) por todos sus consejos apoyo y conocimientos que me brindan.

A todos ellos y los que me faltaron de mencionar gracias por ser la luz de mi vida.

“Vivimos en el mundo cuando amamos.

Sólo una vida vivida para los demás merece la pena ser vivida.”

“Albert Einstein”

**“Si tu intención es describir la verdad, hazlo con
sencillez y la elegancia déjasela al sastre”**

“Albert Einstein”

ABREVIATURAS

A	Alanina
ADC	Arginina descarboxilasa
AdoMetDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
AMPc	Adenosina monofosfato ciclico
ATP	Adenosina trifosfato
AZ	Antizima
AZIN	Anti-anti-zima (inhibidora de AZ)
AZs	Antienzimas
AZ1	Antienzima 1
AZ2	Antienzima 2
AZ3	Antienzima 3
cDNA	DNA complementario
CPM	Cuentas por minuto
Cys, Cys (360-441), C, C360	Cisteina (360-441)
D361	Acido aspartatico (361)
DFMO	Diflurometil ornitina
Dimetil-POPOP	Dimetil- 1; 4-Bis (4-metil-5-Fenil-2 oxazolil) benceno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetracetico
F	Fenilalanina
Lys69, K, K69	Lisina (69)

mRNA	RNA mensajero
ODC	Ornitina descarboxilasa
P	Prolina
PAO	Poliامينoxidasa
PAs	Poliaminas
PEDP	Fosfato de potasio monobasico. EDTA, DTT, PLP.
PLP	Fosfato de piridoxal
PMP	Piridoxamina fosfato
PPO	2,5-Difeniloxazol
Pu	Diamina putresina
RNA	Ácido ribonucleico
Ser	Serina
Spd	Triamina espermidina
Spm	Tetramina espermina
SSAT	Espermina N ¹ -acetiltransferasa
TPA	Acetato 12-O- tetradecanoylphorbol-13
Tris-HCl	2-amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol
V	Valina
Y	Tirosina

ÍNDICE

ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Ornitina Descarboxilasa (ODC).....	2
2.2 Las Poliaminas.....	3
2.3 El ciclo de la biosíntesis de las poliaminas.....	5
2.4 Ruta metabólica alterna de síntesis de Pu en mamífero.....	7
2.5 Gen de la ODC.....	8
2.6 Bioquímica de la ODC.....	9
2.7 Regulación de la ODC.....	10
2.8 Antizimas.....	13
2.9 El Proteosoma.....	14
2.10 El Inhibidor de AZ.....	15
2.11 Determinación de la actividad de la ODC.....	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. HIPÓTESIS	21
6. OBJETIVO GENERAL	22
6.1 Objetivos particulares.....	22

7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1 Equipo.....	23
7.2 Preparación de reactivos.....	23
7.3 Materiales biológicos.....	24
7.4 Grupos de estudio.....	25
7.5 Ensayo de la actividad de la ODC.....	26
7.6 Prueba estadística.....	32
8. RESULTADOS	33
8.1 Grupo 1.....	33
8.2 Grupo 2.....	34
8.3 Grupo 3.....	35
8.4 Grupo 4.....	36
8.5 Grupo 5.....	37
9. DISCUSIÓN	40
10. CONCLUSIONES	44
11. PERSPECTIVAS	45
12. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Esquema ODC.....	2
2. Función de las PAs.....	5
3. Esquema ciclo de las PAs.....	6
4. Ruta alterna síntesis de Pu.....	7
5. Esquema de la región promotora cajas E.....	11
6. Principales interacciones de ODC.....	12
7. Esquema AZ1.....	13
8. Función de la AZ1.....	15
9. Flujograma 1.....	25
10. Flujograma 2.....	27
11. Flujograma 3.....	28
12. Flujograma 4.....	29
13. Flujograma 5.....	30
14. Flujograma 6.....	31
15. Tabla 1.....	33
16. Grafica 1.....	33
17. Tabla 2.....	34
18. Grafica 2.....	35
19. Tabla 3.....	35
20. Grafica 3.....	36
21. Tabla 4.....	36
22. Grafica 4.....	37

23. Tabla 5.....	37
24. Tabla6.....	38
25. Grafica 5.....	39

1. RESUMEN

La ornitina descarboxilasa (ODC) es una de las enzimas limitantes del metabolismo de las poliaminas (PAs). La ornitina es producto de la transformación de la arginina y es sustrato de la ODC. Esta enzima descarboxila a la ornitina y en su lugar se adiciona un grupo amino, para formar la diamina putrescina (Pu). La Pu es la primera molécula en la biosíntesis de las PAs y es el precursor de la biosíntesis de la triamina espermidina (Spd) y esta a su vez para la síntesis de la tetramina espermina (Spm). Tanto la ODC como las PAs son ubicuas e importantes ya que participan en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, así como moduladores de la expresión génica durante el ciclo celular.

En eucariontes la ODC esta conformada de un homodimero. Hacia el extremo C-Terminal de las subunidades que conforman la ODC, se encuentra el sitio de interacción con el sustrato y en el extremo N-Terminal encontramos el sitio de unión del fosfato de piridoxal que actúa como cofactor enzimático. Por otra parte la ODC cuenta con sitios de unión para la antizima (AZ) los cuales están ubicados en el extremo C-Terminal. La unión de la AZ a la ODC provoca un cambio conformacional que expone un sitio de unión oculto en el extremo C-Terminal, que facilita la degradación de la ODC por el proteosoma 26S.

La actividad ODC es baja en células en reposo, pero durante el crecimiento celular existe un aumento dramático en la función de la ODC. En el caso de células neoplásicas el contenido de la ODC y su actividad se eleva considerablemente y por consiguiente el de las PAs. Debido a esto diferentes autores proponen que la ODC es blanco de algunos oncogenes, los cuales regulan su expresión en la mayoría de los tipos de cáncer.

Las PAs ubicuas son la Pu, la Spd y la Spm. Estas son necesarias para la proliferación y la homeostasis celular. Determinar la variación de sus niveles es de mucha utilidad como biomarcador, sin embargo no es suficiente medir el contenido de PAs para el estudio de su metabolismo, ya que el contenido intracelular se regula de manera muy precisa a través de su biosíntesis, degradación, incorporación y/o excreción. Por lo tanto es útil cuantificar también la actividad de las diferentes enzimas involucradas en las vías metabólicas.

La actividad de la ODC se ha medido en diferentes tipos de células y tejidos por radiometría entre ellas hongos protozoarios y algunos tejidos de mamíferos. Ésta consiste en exponer ornitina marcada radiactivamente (^{14}C) en su grupo carboxilo terminal, al extracto celular y cuantificar la actividad enzimática a través de la medición $^{14}\text{CO}_2$ con un contador de centelleo.

En el presente trabajo se realizaron modificaciones al protocolo elaborado para protozoarios y hongos en cultivo, propuesto por Calvo-Méndez (1987). Para determinar la actividad de la ODC en diferentes tejidos de ratón BALB/C. los resultados más relevantes para la activación de la ODC son: temperatura 42°C . tiempo de incubación 90 minutos, así como el tejido que mostró una mayor actividad en la ODC fue el renal con respecto al intestino, hígado y mesotelio murino.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Ornitina Descarboxilasa

La Ornitina descarboxilasa (ODC EC 4.1.1.17) ^{1,2,3} es una enzima de la familia de las liasas las cuales actúan eliminando o añadiendo unidades de agua, amoniaco o carboxilo ⁴.



Figura 1. Esquema del homodimero de ODC de humanos tomado de NCBI ²⁹

La ODC como homodimero es una enzima dependiente de fosfato de piridoxal (PLP) y es una de las más importantes para la biosíntesis de poliaminas (PAs), ^{1,3,5, 6, 7} en dicho proceso la ODC transforma a Ornitina en la diamina putresina (Pu) y CO_2 ¹. En eucariontes la ODC es altamente específica para Ornitina, pero también tiene una actividad baja para L-1-lysina y una actividad incluso menor para L-1-arginina ⁸. En vertebrados, la actividad de la ODC varía según el tejido ⁹ y en algunos tejidos se observa que la ODC mantiene su actividad más alta en fracciones de membrana con un pH óptimo de 8.4 que en fracciones que se encuentran en el citosol con un pH óptimo de 7.4 ¹⁰ lo que sugiere un amplio punto isoelectrico o que la proteína sufre algún desplegamiento o interacción aún no descrita, que no afecta su actividad. En células y tejidos en reposo la ODC tiene una actividad baja con una presencia mínima ^{2,5}, pero durante el crecimiento

y diferenciación celular existe un aumento dramático en su actividad⁵ y en el caso de tejidos de células neoplásicas el contenido de ODC, y por consiguiente de las PAs se eleva considerablemente en la mayoría de los tipos de cáncer^{2,7,11}.

El control de la actividad de la ODC en mamíferos es complejo, en parte porque la regulación de la ODC es específica de la célula y el estímulo^{7,8}. A nivel transcripcional se regula, ya que en la región promotora contiene elementos reguladores múltiples que pueden ser estimulados por diferentes factores; dentro de los que destaca los cambios en los niveles de PAs^{7,8,12}. A nivel traduccional se controla por el factor de iniciación eIF-4E activo principalmente, así como también por oncogenes y PAs^{7,8,12}. Por último, a nivel post-traduccional la ODC se regula por tres proteínas, de las cuales dos son inhibidores específicos y una es proteosoma y también es modulada por las PAs^{7,8,12,13}.

Las PAs son compuestos que actúan en los tres niveles de regulación de la ODC, por lo que, actúan como el principal mecanismo de regulación⁷.

2.2 Las Poliaminas

Las PAs son aminas alifáticas ubicuas que tienen bajo peso molecular, cargadas positivamente en condiciones fisiológicas que representan los únicos cationes orgánicos celulares conocidos^{3,14}; en cantidades moderadas son esenciales para el crecimiento, diferenciación y división celular, así como moduladores de la expresión génica durante el ciclo celular, por lo que se consideran un requisito para el funcionamiento óptimo de la célula^{7,15,16}. Así también, se conoce la relación entre los niveles altos de PAs y la proliferación rápida de procariontes y eucariontes¹⁹. Las PAs por su carácter policationico, su flexibilidad y su distribución de carga a lo largo de la cadena hidrocarbonada, se pueden unir a moléculas cargadas negativamente tales como ácidos nucleicos,

proteínas o fosfolípidos, para estabilizar su estructura ^{18,20}. Dado que se requieren en la división celular, su distribución dentro del organismo se favorece en aquellos tejidos y órganos que se encuentran en crecimiento o división activa ¹⁷. Ésto se confirma en un estudio reciente realizado por Reynoso (2004)⁴⁹, donde encontró que en tejidos de ratón los niveles de las PAs varía según el tejido que se trate y que sus niveles pueden modificarse por el desarrollo tumoral, pero aun así, se desconoce si los niveles de las PAs son consecuencia de la actividad de la ODC o de la incorporación de las PAs del exterior de la célula.

Por otro lado, varios estudios recientes en cultivo celulares ligan a las PAs y su catabolismo con la apoptosis. Se cree que el peróxido de hidrógeno generado por la acetilación y la oxidación subsecuente de Spm y Spd, aumenta el grado de muerte celular. Así también, la Spm se considera que puede funcionar como un sistema de eliminación de radicales libres ¹⁸.

Aunque las PAs son esenciales para el crecimiento normal de la célula, la actividad creciente de ODC más allá de su umbral mínimo, puede inducir a la transformación de una célula normal a neoplásica y la formación de tumores ⁷.

La importancia creciente que tiene la ODC en la regulación de la biosíntesis de las PAs así como el papel de dichas aminos en diversos procesos biológicos, explica el esfuerzo para cuantificar estos compuestos en diversos fluidos corporales incluyendo el plasma, la orina, el suero y el plasma seminal ¹.

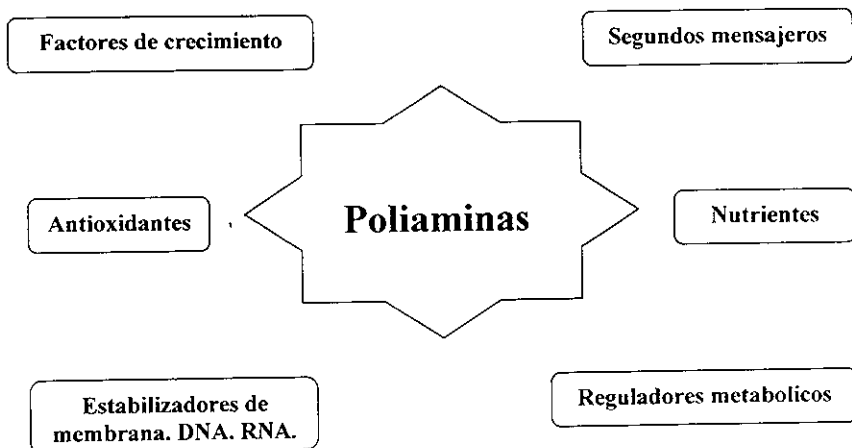


Figura 2. Donde se representan las funciones de las poliaminas modificado de Wallace H. M. (2000)¹⁸.

Por lo anterior, las PAs y la ODC se proponen como indicadores de la presencia de procesos proliferativos²¹. Grupos de investigadores estudian y utilizan los niveles de PAs y la actividad de la ODC en tejidos con crecimiento anormal para el pronóstico y seguimiento del cáncer^{22,23}.

2.3. El ciclo de la biosíntesis de las poliaminas

En el metabolismo de las PAs, la ornitina es un subproducto de la arginina, y es el sustrato de la ODC. La ODC retira un grupo carboxilo (COOH) a la ornitina y en su lugar se adiciona un grupo amino (NH₂), para formar a la Pu¹¹. La Pu (NH₂-(CH₂)₄-NH₂) es una molécula con dos grupos amino ligados a una cadena hidrocarbonada. Dicha diamina y la Adenosil metionina [Ado-S (CH₃)CH₂CH₂CH₂NH₃⁺] son sustratos para la enzima Espermidina Sintetasa (EC 2.5.1.16) misma que genera a la Spd [NH₂-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-NH₂]; ésta última molécula y otra adenosil metionina son utilizadas como sustrato por la Espermina Sintetasa (EC 2.5.1.22) para dar origen a la Spm (NH₂-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-NH-(CH₂)₃-NH₂), que es la última PA de la vía biosintética.

Por otro lado, la metionina es adenilada por la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa (AdoMetDC) (EC 4.1.1.50) y algunos autores proponen también a esta enzima, como limitante para la síntesis de PAs además de la ODC, dado que representa la única manera de introducir metionina en forma de grupos amino propil²⁴ para el metabolismo de las PAs¹⁴. Hay una vía catabólica de las PAs, y se desarrolla al adicionar un grupo acetilo en la posición *N*^l de Spm o Spd por acción de la enzima espermidina/espermina *N*^l-acetiltransferasa (SSAT) y esta enzima se propone como limitante del catabolismo, dada su importancia en el control de los niveles de PAs dentro de la célula^{14,25}. La acetilación de Spd y Spm las convierte en sustrato de la enzima Poliaminoxidasa (PAO) (EC 1.5.3.11), dependiente de flavin-adenina dinucleótido y las transforma en Pu o Spd, en forma retrospectiva, además de H₂O₂ y 3-acetamido propanal²⁶.

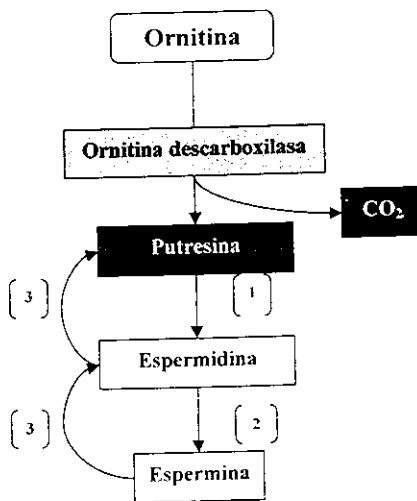


Figura 3. Esquema del ciclo de las poliaminas [(1) Espermidina sintetasa, (2) Espermina sintetasa, (3) Poliaminoxidasa] modificado de Jean Paul Buts (2006)⁴⁸.

2.4. Ruta metabólica alterna de síntesis de Pu en mamíferos

Recientemente se propone un mecanismo alternativo de síntesis de las PAs en tejidos de mamíferos, vía arginina/agmantina/putresina que solo se ha descrito en plantas, bacterias y algunos patógenos de las plantas^{10,27,28}. Ésto ocurre vía la descarboxilación directa de la arginina y genera CO₂ y agmantina y esta última se convierte en la Pu directamente por la agmantinasa (ureohidrolasa de agmantina) en algunos microorganismos tales como *Escherichia coli*, o en un proceso de dos etapas que implican a la agmantina diaminasa y a la N-carbamoyl-putresina hidrolasa que ocurre en otros microorganismos tales como *Pseudomonas aeruginosa* y plantas. En tejidos de mamíferos la síntesis de PAs se realiza por la vía de Arginina/Arginina descarboxilasa (ADC)/Agmantina/agmantinasa/putresina²⁸.

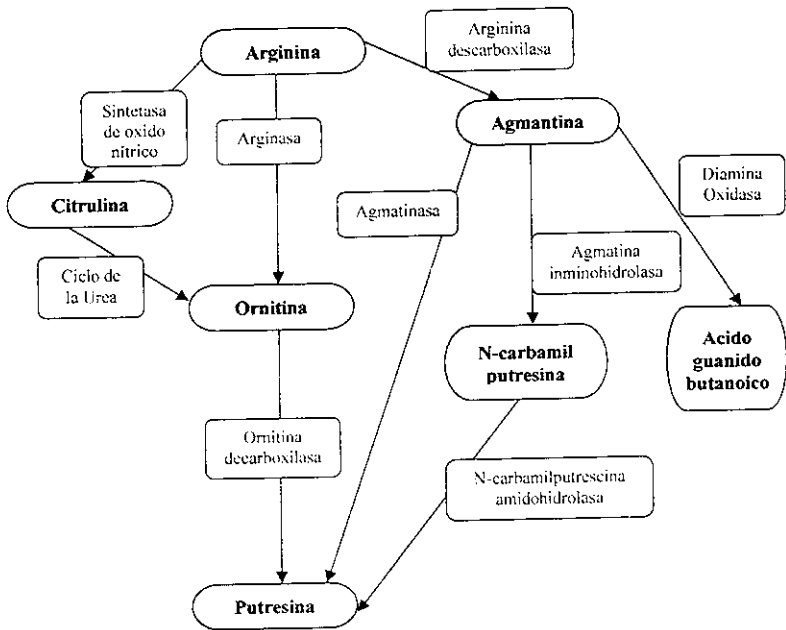


Figura 4. Ruta alterna para la síntesis de putresina modificado de Coleman (2004)²⁸.

Se cree que el gen de Arginina descarboxilasa, en humanos se encuentra en el cromosoma 1 p33-34.3; consta de 39kb y contiene 11 exones ^{2,27}, y dicho gen codifica para la enzima ADC (EC 4.1.1.19) ¹¹, la cual es dependiente de fosfato de piridoxal y se encuentra asociada a la membrana de la célula ²⁷, dicha enzima descarboxila a la ornitina o a la arginina ya que es muy similar a la ODC de mamíferos pero distinta a la ADC de bacterias y plantas ^{2,27,28}.

En un estudio reciente publicado por el grupo de Pegg (2004) se comprobó que la evidencia obtenida por los trabajos anteriores de Zhu (2004) y Pitkanen (2000) no son suficientes para explicar la acción de la ADC en el ciclo de las PAs, así como la existencia de una ADC de mamíferos, ya que ellos encontraron que aunque la L-(U-¹⁴C)-arginina produjo ¹⁴CO₂ en cantidades sustanciales no se detectó agmatina o Pu marcada y que al agregar agmatina a extractos de hígado no era degradado por algún metabolismo adicional. Se elaboró una búsqueda extensa en la base de datos actual del genoma con secuencias no mamíferas de ADC y no se identificó un gen candidato para ADC ²⁸. Por todo esto se cree que la ODC cataliza la reacción de descarboxilación de arginina ¹⁰. La descarboxilación de l-L-Ornitina es la única ruta establecida para la biosíntesis de Pu en mamíferos ²⁸.

2.5. Gen de la ODC

El gen que codifica para la ODC de algunos eucariontes como levaduras, *trypanosoma*, hámster, rata, ratón y humano ya se han secuenciado. En humanos se encuentra en el cromosoma 2 y en ratón: en el cromosoma 12 ^{2,29}.

La región promotora del gen *odc* contiene múltiples secuencias que permiten la respuesta a hormonas, factores de crecimiento, estrógenos, glucocorticoides, promotores de tumor, AMPc, acetato 12-O-tetradecanoylphorbol-13 (TPA) y factores transcripcionales ^{8,12,30}.

Si se comparan los sitios activos de la ODC del humano, ratón y tripanosoma se observan secuencias altamente conservadas²⁴.

Con base a la clonación del cDNA del gen *odc* fue posible describir y comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente, en diferentes organismos representativos de la escala biológica. Se observan similitudes de más del 90% entre mamíferos, 81% con *Xenopus*, con *Tripanosoma* 69%, *Neurospora* 42% y 40% con levadura⁹.

2.6. Bioquímica de la ODC

En eucariontes, la ODC se conforma por dos monómeros idénticos (461 aminoácidos cada uno en ratón) que por separado son inactivos y al unirse débilmente, forman un homodímero activo de 106 kDa, que crea dos sitios activos formados en la interface del dímero entre el dominio N-terminal de una subunidad y el dominio de C-terminal de la otra^{8,12,13}.

Para el funcionamiento óptimo de la ODC se requiere el desplazamiento de la enzima hacia el citoesqueleto de la membrana².

La ODC biológicamente activa tiene diferentes sitios de unión, hacia el extremo N-terminal de una de las subunidades, se forma el sitio de unión con el cofactor Fosfato de Piridoxal (PLP), el PLP se une a un residuo lisil y forma una base de Schiff con el mismo. En todos los eucariontes estudiados, el cofactor se une al aminoácido Lys 69 el cual se encuentra en una secuencia conservada de 7 aminoácidos -PFYAVKC-^{8,31}. La actividad de ODC es dependiente de PLP, que al efectuarse la reacción se transforma en PMP que se intercambia fácilmente por PLP libre, y restaura la formación catalítica de la enzima. Concentraciones altas de agentes tiol-reductores como el ditioneitol (DTT) aumentan y mantienen la actividad de ODC^{6,32}. En el extremo C-terminal de una de las subunidades se encuentra el sitio de interacción del sustrato (omitina) y

los residuos más importantes para la actividad de ODC son K69, C360, y D361 ². En la proteína ODC existe la región que contiene al aminoácido Cys-360 que desempeña un papel importante en la química de la reacción ODC/ornitina. en dicho aminoácido se une de forma covalente e irreversible la difluorometil omitina (DFMO) y esto inhibe la actividad de la enzima ^{6,8,9,16,25,31,32,33,34}.

Se encontró que ODC se puede inactivar fácilmente por el óxido nítrico debido a la sensibilidad de este residuo Cys a la nitrosilación ⁸.

Por otro lado, se encontró que la región interna (117-140 aminoácidos en ratones) que es conservada altamente en mamíferos, se liga con la Antizima (AZ), esta se une preferencialmente al monómero y se necesita para la inhibición pero no es suficiente para dirigirlo al proteosoma y ser degradado ^{2,8,13}.

Una región importante para la degradación de ODC se encuentra en la región C-terminal, al eliminarse los 37 residuos que la conforman, hace estable a la proteína en presencia de la AZ, en dicha secuencia de aminoácidos se encuentra el residuo Cys-441 que al ser cambiado por Ser, la ODC se estabiliza totalmente ^{8,13,24}.

2.7. Regulación de la ODC

De manera general la regulación de la actividad de la ODC se lleva a cabo por mecanismos de control transcripcional, traduccional y post-traduccional. La regulación negativa de la transcripción de la ODC esta dada por la retroalimentación de las PAs ⁴¹.

En cuanto a la regulación positiva de la transcripción, se ha demostrado que diversos factores aumentan la síntesis de mRNA de ODC: un ejemplo es la actividad incrementada del oncogen *myc/max* como se mencionó antes, los cuales se unen a dos regiones del promotor de la ODC

llamadas cajas E (CACGTG) y estimulan la síntesis del mRNA. Pero cuando la célula se encuentra en un estado quiescente (de reposo) los espacios de las cajas E (CACGTG) son ocupados por la forma inactiva de *mnt/max*^{8,12,30}.

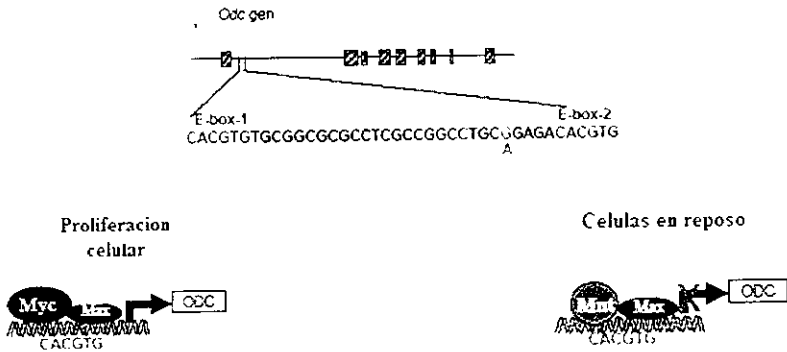


Figura 5. Esquema en el que se aprecia el sitio donde se encuentran las dos cajas E en el gen de *odc* (para factores transcripcionales.) Y un esquema de como *cMyc/Max* o *mnt/max* se unen a las cajas E modificado de Pegg Anthony

E. (2006)⁸.

El segundo nivel de la regulación de la ODC se da en la traducción de un mRNA, se regula negativamente por el contenido alto de PAs. en la célula dicho mecanismo de regulación no está claro aún^{8,12}.

La regulación positiva de la traducción del mRNA de la ODC es dependiente de su estructura secundaria pero responde a la disponibilidad intracelular del factor eIF-4E activo y a la unión de la unidad de traducción con el complejo eIF-4F, que media la iniciación de la traducción¹².

Un aumento en el factor eIF-4E activo puede permitir la síntesis de la proteína incluso en presencia de niveles elevados de PAs¹². Por otra parte el oncogen *ras* tiene efectos estimulantes en el contenido y la traducción del mRNA de la ODC⁸.

El tercer nivel de regulación de la ODC se da en la postraducción y es mediado por la unión de las AZs con la ODC ^{32,42}.

Cuando la ODC tiene una actividad exacerbada en la célula, el nivel de PAs aumenta y estimula la biosíntesis de la AZ, eficientando su marco de lectura ribosomal. La AZ interactúa con uno de los monómeros de la ODC, que se facilita por la asociación débil entre las sub-unidades de la ODC y provoca la exposición de una región C-terminal que normalmente se encuentra oculta en la ODC, la cual reconoce el proteosoma 26S. Ya que la ODC se reconoce por el proteosoma 26S se requiere de la hidrólisis del ATP para inducir cambios conformacionales en la ODC o desplazarla a la cavidad interna del proteosoma y así exponer a la ODC a los sitios catalíticos del proteosoma. Por otro lado, la AZ suprime el transporte celular de PAs, por lo que es un eficaz inhibidor de niveles intracelulares de PAs. Cuando los niveles de PAs disminuyen, se activa la enzima inhibidora de la AZ que es más afín que la ODC con la AZ por lo que separa la AZ de la ODC y se restablece la función de la ODC ^{7,8,12,13}.

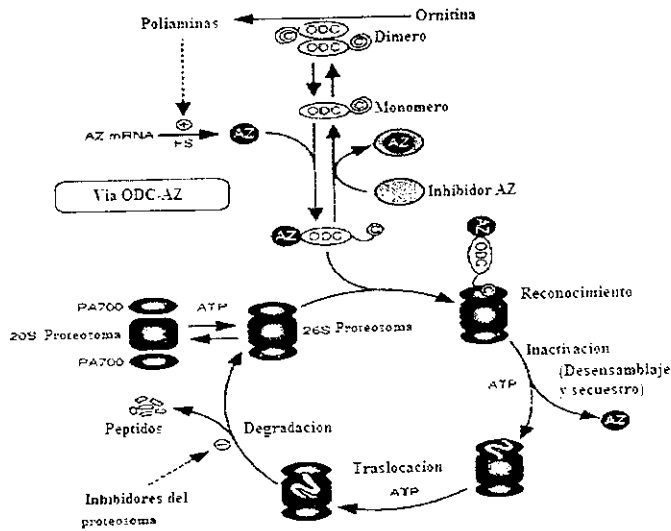


Figura 6. Principales interacciones de ODC con otras moléculas, modificado de Murakami Yasuko (2000)¹³.

2.8 Antizimas (AZs)

Actualmente se conocen tres tipos de AZs, que inhiben específicamente a la ODC y se distinguen como 1, 2 y 3; las dos primeras están presentes en numerosos tejidos de mamíferos al igual que ODC, mientras que Antizimas 3 (AZ3) se restringe a células germinales^{2,8,35}.

El gen de la Antizima 1 (AZ1) se encuentra en el cromosoma 10 en ratón y en el humano en el cromosoma 19 p13^{36,37,38}. En la mitad del C-terminal de la proteína se encuentra una sección de residuos (106-212) que están implicados en la interacción de AZ1/ODC⁸.

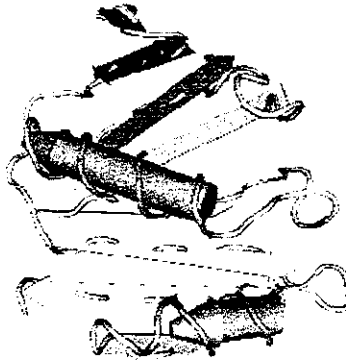


Figura 7. Esquema del inhibidor de ODC el AZ1 tomado de NCBI³⁶.

AZ1 es un inhibidor no competitivo que aumenta la susceptibilidad a la degradación de la ODC por el proteosoma ya que realza la interacción entre ellos sin alterar el índice del proceso proteosomal como se explica más adelante^{8,12,13}. Recientemente se divulgó que la inducción de la AZ1 bloquea el transporte de las PAs a nivel de membrana⁸.

La síntesis de la AZ1 se modula, vía un marco de lectura ribosomal abierto, regulado por la concentración de PAs, las cuales facilitan la traducción de la AZ1 e inhiben su degradación

dependiente de ubiquitinación^{7,8}. La disponibilidad de AZ1 se regula por una proteína homóloga de ODC, que es la anti-antizima (AZIN) que se activa por los niveles bajos de PAs en las células^{2,7}.

La antizima 2 (AZ2) se descubrió en 1998. El gen de AZ2 es similar al de AZ1 y el producto resultante de la traducción del gen codifica 189 aminoácidos y presenta 54% de homología con la AZ1. La AZ2 de humano y de ratón difieren por un sólo aminoácido. También se ha reportado que la AZ2 inhibe a la ODC, aunque no acelera su degradación. Además, el patrón de expresión de AZ1 es 16 veces más abundante que el de AZ2^{8,40}.

La AZ3 se restringe a células germinales en testículos de mamíferos y se expresa desde la espermatogenesis temprana hasta la última fase de la espermatida^{2,35}.

2.9. El Proteosoma

Es la principal enzima encargada de degradar a la ODC mediada por la AZ1 dependiente de ATP e independiente de ubiquitinación, consta de un complejo de multisubunidades, que consiste en una proteína central (llamada proteosoma 20S) y dos subcomplejos reguladores terminales llamados PA700 (también llamados el complejo 19S) y PA28 (equivalente al regulador 11S), que se unen a ambos extremos de la porción central. El proteosoma 20S es una partícula en forma de cilindro dispuesto como cuatro anillos heptaméricos. La interacción entre el proteosoma 20S y los complejos reguladores PA700 y PA28 abre probablemente el canal proteosomal para la entrada del sustrato, de tal modo que tiene acceso a los sitios catalíticos del proteosoma. En las células existen por lo menos cuatro diversas formas del proteosoma: proteosoma 26S (con PA700 en ambos extremos), proteosoma 20S (sin las proteínas reguladoras), proteosoma homo-PA28 (con PA28 en sus extremos) y el proteosoma hidro-tipo (con un PA28 y un PA700 que contiene

hetero-complejos). La degradación de ODC por el Proteosoma 26S es dependiente de ATP e independiente de ubiquitinación. El complejo de la subunidad PA700 contiene seis ATPasas que pueden explicar dicha dependencia de energía ¹³.

2.10. El Inhibidor de AZ

El control en la actividad de la AZ se ejerce por la enzima inhibidora de Antizima (AZIN) que tiene semejanzas sustanciales con la ODC pero no tiene actividad de ODC. El gen que codifica para la AZIN se encuentra en el cromosoma 8 en humanos. Los monómeros de ODC y del AZIN no forman heterodímeros ^{2,7,8}.

El AZIN tiene una mayor afinidad con AZ que ODC por lo que destruye los complejos ODC/AZ y se une a AZ para formar complejos de AZIN/AZ y evitan que la ODC se degrade ^{7,8}.

El AZIN está implicado en la regulación de ODC estabilizándola, al atrapar a la antizima ⁷. Esto provoca que niveles bajos del AZIN disminuyan la cantidad y la actividad de ODC ⁷.

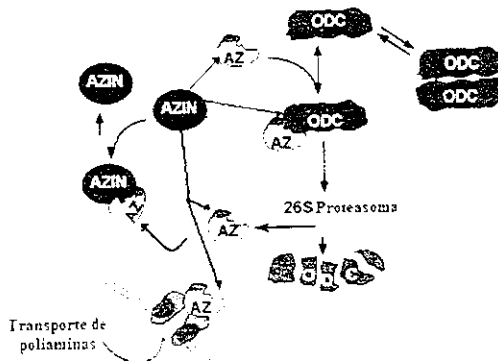


Figura 8. Representación de las funciones que tiene la AZI; modificado de Pegg (2006)⁸.

2.11. Determinación de la actividad de ODC

Ya que la ODC es una de las enzimas más importantes para la biosíntesis de las PAs, ésta ha recibido más atención que las otras enzimas. Además puesto que la ODC tiene una función importante durante el crecimiento y diferenciación celular así como en muchos procesos fisiológicos y patológicos como el cáncer, es importante y útil tener un método simple para probar su actividad como herramienta en lo particular para seguir el desarrollo del cáncer ^{1,2,5,7,11,43}.

Se han descrito y desarrollado varios protocolos para la determinación de la actividad de ODC dentro de los que destaca: el método quimioluminiscente o colorimétrico, métodos cromatográficos y el método radiométrico que convencionalmente se usa ^{1,43}.

El método quimioluminiscente se basa en la purificación parcial de la oxidasa diamina de riñón de cerdo o de la diamina oxidasa de la soya, que oxida a la putresina y forma H_2O_2 que reacciona con 4-aminantipyrina y fenol y forma un complejo coloreado que se lee a 492 nm. Dicho método tiene la desventaja de la purificación previa y si no se realiza adecuadamente se corre el riesgo de tener datos erróneos en los resultados finales. Otra desventaja grave del método es que la oxidasa no oxida exclusivamente a Pu si no que también oxida a Spd y propanodiamina ^{1,43}, por lo que se utiliza poco.

El método por cromatografía de capa fina, aunque es sensible, tiene la desventaja de usar tiempos prolongados y la necesidad de una pre-cromatografía de columna en gel de sílicona ¹.

Otro método cromatográfico es la cromatografía de gases que utiliza análogos de PAs como estándares internos. Es sensible, pero requiere procedimientos extensos de limpieza de las muestras así como del instrumental necesario que debido a sus altos costos dificulta su uso en el laboratorio ¹.

El método de radioinmunoanálisis que implica una reacción del Ac antiespermina con la Spd y la Spm, podría ser una herramienta útil para el análisis de la actividad debido a su sensibilidad y simplicidad pero hasta el momento no se ha descrito ningún anticuerpo contra la Pu¹.

El método convencional usado para determinar la actividad de ODC ha sido el radiométrico ya que es fácil de elaborar y es útil para análisis tanto *in vitro* como *in vivo*. Además se adapta específicamente al análisis de la actividad de la ODC¹.

La radiometría se utiliza para estudiar la actividad de la ODC en hongos, protozoarios y algunos tejidos de mamíferos, como el epitelial en ratón que sirven como modelo para el estudio del cáncer. Dicha técnica esta formada principalmente por dos pasos que son: Preparación del extracto y prueba y medición de la actividad. En la preparación del extracto descrita por Calvo-Méndez se toman de 2-4 g de células de hongos y se suspenden en 20 ml de amortiguador KH_2PO_4 0.1 M, a un pH de 7.3, con EDTA 1 mM, ditioneitol 2 mM y PLP a 0.2 mM (PEDP, amortiguador) la muestra se mezcla con 20 ml de las perlas de cristal de 45-50 milímetros y se homogenizan durante 45s en un homogenizador modelo Braun MSK. El extracto se centrifuga a 41.000 g (Rav) por 30 min., y el sobrenadante se recupera y se hace pasar por una columna de Sephadex G-25 (2x20), equilibrada y enjuagada por el amortiguador PEDP; el volumen recuperado se utiliza como la fracción enzimática. El siguiente paso descrito por Calvo-Méndez, es la prueba de actividad, la cual consiste en utilizar frascos de Erlenmeyer (10 ml) que contienen un pozo en el centro, en el cual se coloca un papel filtro con 25 μl de NaOH al 20%, después la fracción enzimática o muestra se dispersa en el compartimento externo y se le agrega la L-[1-¹⁴C] ornitina y comienza la reacción. Se sella el frasco con un tapón de goma y se incuba a 30°C por 30 o 60 min. Después del tiempo de la incubación, la reacción se para con 100 μl de HCl 3N inyectado por medio del tapón de goma en el compartimento externo y se deja el frasco tapado

toda la noche para que el CO₂ reaccione con el álcali del papel filtro y así sea fijado. Por último, el papel filtro se seca a 60°C, y se coloca en viales con el líquido de centelleo para su cuantificación en el contador. La actividad se expresa como nanomoles de CO₂ producidos en 1 min^{44,45}. Por lo que en el presente estudio, se estandarizó dicha técnica en diferentes tejidos de ratón BALB/C y se identificó el tejido con mayor actividad de la ODC en el modelo de linfoma murino L5178Y, el cual tiene múltiples aplicaciones en estudios sobre el cáncer e inmunológicos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las PAs son útiles como biomarcadores de la proliferación celular en un modelo de linfoma L5178Y inoculado en el ratón BALB/c. La ODC es la principal enzima limitante del metabolismo de las PAs y es útil como biomarcador tumoral. En el modelo de linfoma murino L5178Y es necesario estandarizar la técnica radiométrica para medir la actividad de la ODC en los diferentes tejidos, ya que los niveles de PAs varían según el tejido y no se sabe si se deba a la actividad de la ODC o a la incorporación de PAs externas, por lo que en el presente trabajo, se propone estandarizar dicha técnica para utilizarla como biomarcador tumoral para estudiar los fenómenos bioquímicos de las PAs. Lo que permitirá su aplicación en los distintos esquemas de tratamiento contra el cáncer.

4. JUSTIFICACIÓN

La ODC es una molécula importante en la evolución progresiva del cáncer, por tal motivo es importante tener técnicas y métodos que nos permitan evaluar su actividad en tejidos de ratón y en particular en el modelo de linfoma murino L5178Y, dado que algunas propuestas de tratamiento contra el cáncer consisten en inhibir la actividad de la ODC.

El presente trabajo pretende estandarizar la técnica radiométrica para determinar la actividad de la ODC en diferentes tejido de ratón, ya que la actividad de ODC y la distribución de las PAS varía según el tejido.

5. HIPÓTESIS

Es factible estandarizar y determinar la actividad de la ODC por medio del ensayo radiométrico en tejidos de ratón y utilizarla como biomarcador del desarrollo neoplásico.

6. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica radiométrica para la determinación de la actividad de la ornitina descarboxilasa en tejido de ratón BALB/c.

6.1. Objetivos particulares

1. Estandarizar las condiciones para la medición de la actividad de ODC en los diferentes tipos de tejido de ratón BALB/c.
2. Identificar el tejido de ratón BALB/c que muestra mayor actividad de la enzima ODC y verificar si el tejido seleccionado sirve como biomarcador de la evolución tumoral.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Equipo

Homogenizadores Potter

Homogenizadores Braun MSK

Mortero

Balanza OHAUS Sapphire 500

Balanza Sartorius BL60S

Pipetas JENCONS SEALPETTE rango variable

Potenciómetro ORION modelo 210A

Cuarto frío

Centrifugadora HERMLE Z233 MK-2

FELISA Termo baño

FELISA Horno

Contador de centelleo BECKMAN LS6000 SE

7.2. Preparación de reactivos

Solución de Ornitina

Solución 1: 50 μ curies (Sigma) en 1 ml de etanol al 2% (Merck)

Solución 2: 100 μ l de la solución 1 + 900 μ l de etanol al 2%

Solución 3: 90 μ l de la solución 2 + 60 μ l de ornitina sin marca radioactiva 20 μ M (Sigma) + 450 μ l de etanol al 2%

Solución de HCl para parar la reacción

Se prepara 500 ml de HCl 1N, (Merck)

Solución de líquido de centelleo

4 gr de PPO (Sigma) + 200 mg Dimetil POPOP (Sigma), se aforan a 2 litros con Tolueno (Sigma).

Solución Amortiguadora

2000 ml de Tris-HCl (Sigma) pH de 8.0 a 100 mM

31.8383 g de Tris-HCl + 2000 ml de agua bidestilada, ésto se lleva a pH 8.0 con KOH (Merck)

Solución de Fosfato de piridoxal (PLP)

2 ml de PLP (Biochemika) a 0.2 mM

0.000107 g de PLP + 2 ml de amortiguador

Solución de Ditiotreitol

2 ml de DTT (Sigma) a 2 mM

0.000624 g de DTT + 2 ml de amortiguador

Solución EDTA 1mM

2ml de Solución EDTA (Sigma) a 1mM

0.0006g de EDTA + 2ml de amortiguador

Solución KOH 5N (fijadora)

Se preparan 250 ml de KOH a 5N (Merck)

7.3. Material biológico

Animales

Se utilizaron ratones singénicos BALB/c machos, de 6 a 8 semanas de edad y 20-24 g de peso, se alojaron en jaulas de policarbonato. Los animales se mantuvieron en habitaciones con temperatura controlada de 22 °C y ciclos alternos de iluminación-oscuridad de 12 h, se

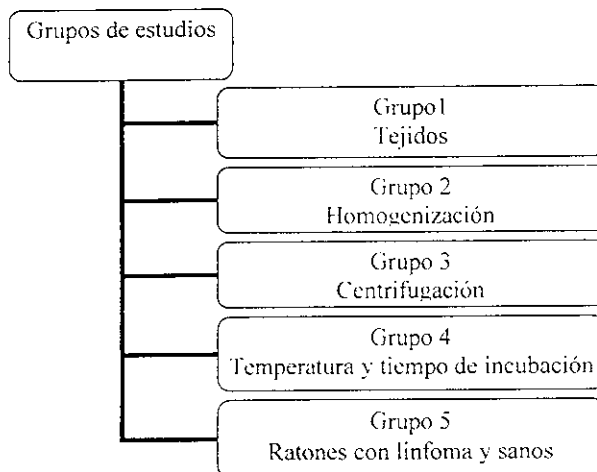
alimentaron con una dieta balanceada especial para roedores (PURINA-México) y agua purificada a consumo voluntario; todos los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.

Células tumorales

Se utilizaron como modelo el linfoma murino L5178Y, el cual es un tumor de estirpe tímica (haplotipo H-2^d) originado por tratamiento con metilcolantreno ⁴⁶. Se mantiene por trasplante intraperitoneal semanalmente en ratones BALB/c. El tumor es de alta malignidad ya que 2×10^7 células L5178Y inoculadas por vía i.p., mata a los ratones en 15 ± 2 días, el cual se utiliza para el grupo 5 de dicho estudio y se inocularon 2×10^4 células L5178Y, 17 días antes del experimento.

7.4. Grupos de estudio

Se formaron 5 grupos de estudio los cuales fueron: (grupo 1) tipo de tejido, n=4 ratones (grupo 2) método de homogenización, n=8 ratones. (grupo 3) Condiciones de Centrifugación, n=6 ratones. (grupo 4) temperatura y tiempo de incubación, n=10 ratones, y (grupo 5) Ratones sin y con linfoma, n=10 ratones, divididos en 5 sanos y 5 con linfoma.

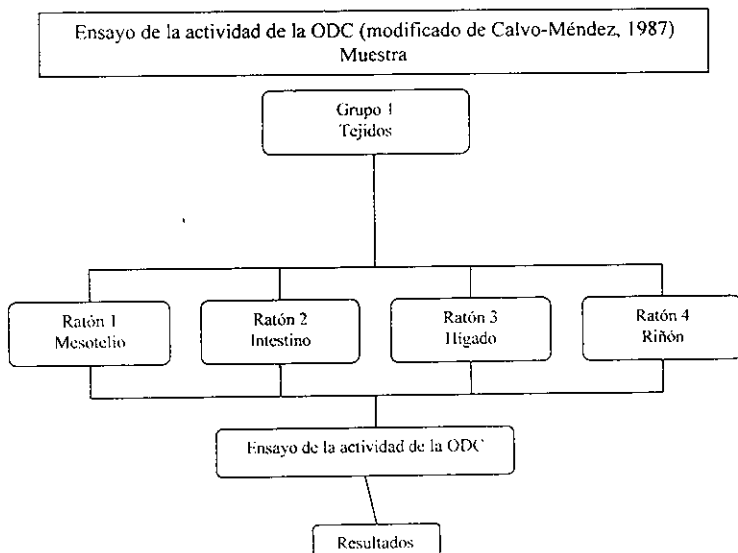


flujograma 1. Se muestran los diferentes grupos de estudio

7.5. Ensayo de la actividad de la ODC (modificado de Calvo-Méndez, 1987)⁴⁵

La medición de la actividad de ODC se realizó en el laboratorio del doctor Calvo-Méndez en el Instituto de Investigación en Biología Experimental (IIBE) en la Facultad de Química de la Universidad de Guanajuato. Dicha determinación mide la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[1- ^{14}C] ornitina como lo describe el protocolo de Calvo-Méndez (1987)⁴⁵, con las modificaciones pertinentes para el modelo de estudio, el ratón BALB/c. Los cambios son en el tipo de muestra, homogenización, Centrifugación, Temperatura y tiempo de Incubación. Todos los ensayos fueron por duplicado y los resultados se representan en medias.

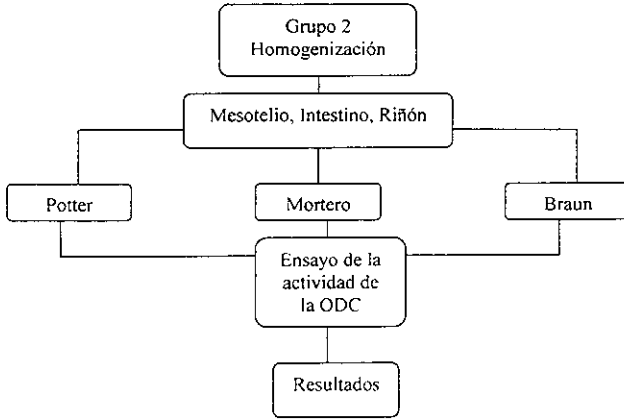
En el grupo I se mantienen las condiciones pero con algunas modificaciones mínimas en el tipo de amortiguador, pH y tipo de fijador de CO_2 (permanentes para todos los grupos) del protocolo de Calvo-Méndez (1987), se modifica el tipo de muestra a analizar. Se obtiene mesotelio, intestino, hígado y riñón, se hace el ensayo de actividad finalmente tratando de lograr la mejor respuesta de cuentas por minuto (CPM), se analizaron los resultados para pasar al siguiente ensayo.



Flujograma 2. Muestra los cambios del experimento I con respecto a el ensayo de Calvo-Méndez

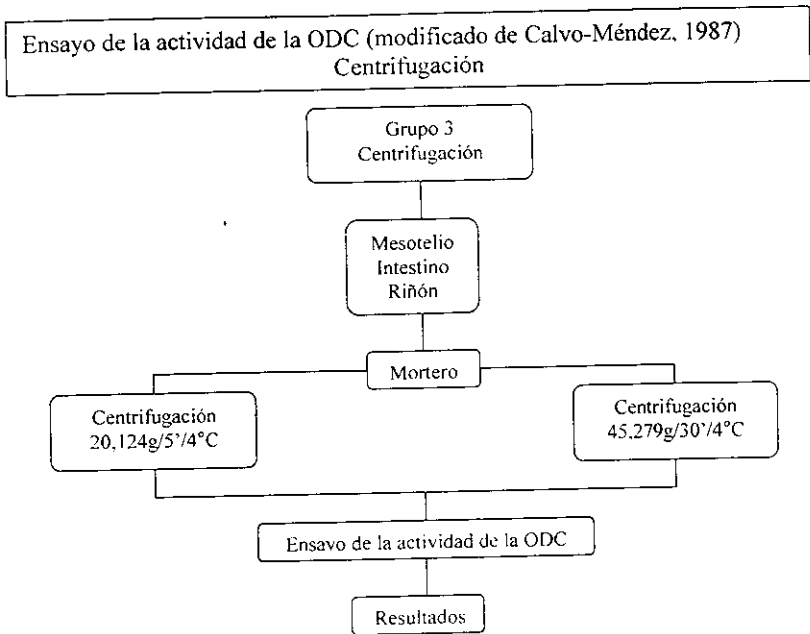
En el grupo 2 se mantienen las condiciones del Protocolo de Calvo-Méndez. se modifica el tipo de muestra previamente seleccionada y el método de Homogenización: con Potter (n=3) con cada uno de los tejidos. mesotelio, intestino, riñón. En Mortero (n=3) ratones que corresponden a cada uno de los tejidos mencionados. Braun (n=2) ratones que corresponden a los tejidos de mesotelio e intestino y se realizó el ensayo de actividad como se mencionó. Por último se analizaron los resultados para realizar el siguiente paso.

Ensayo de la actividad de la ODC (modificado de Calvo-Méndez, 1987)
Homogenización



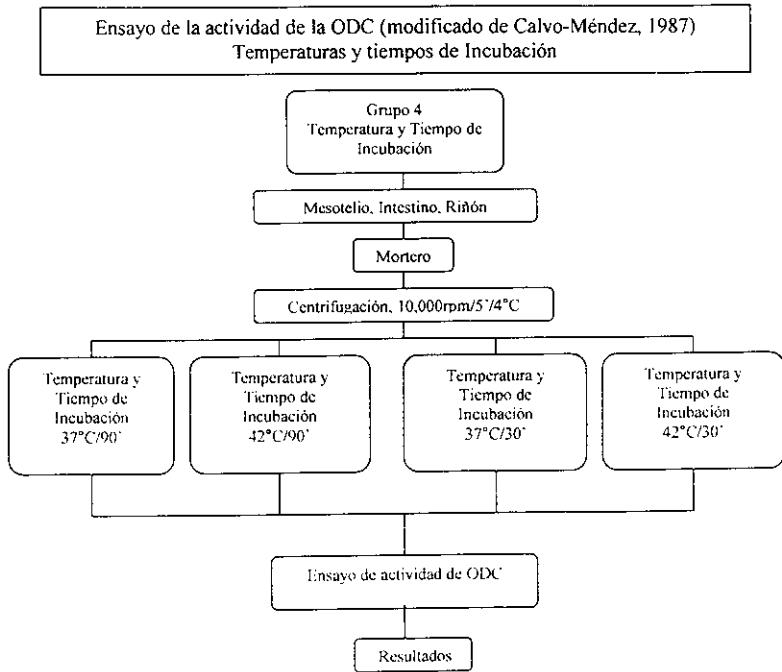
Flujograma 3. Muestra los cambios del experimento 2 con respecto al experimento 1 y el ensayo de Calvo-Méndez

En el grupo 3 se mantienen las condiciones del Protocolo de Calvo-Méndez, con las modificaciones de tipo de muestra y homogenización con mortero que previamente se seleccionaron y se agregó la modificación de condiciones de Centrifugación. Centrifugación a 20124g/5'4°C y 45279g/ 30'4°C con 3 ratones cada uno. Cada ratón corresponde a los tejidos de mesotefio, intestino y riñón y se hace el ensayo de actividad y su medición. Se analizaron los resultados para pasar al siguiente ensayo.



Flujograma 4. Muestra los cambios del experimento 3 con respecto al experimento 1,2 y el ensayo de Calvo-Méndez

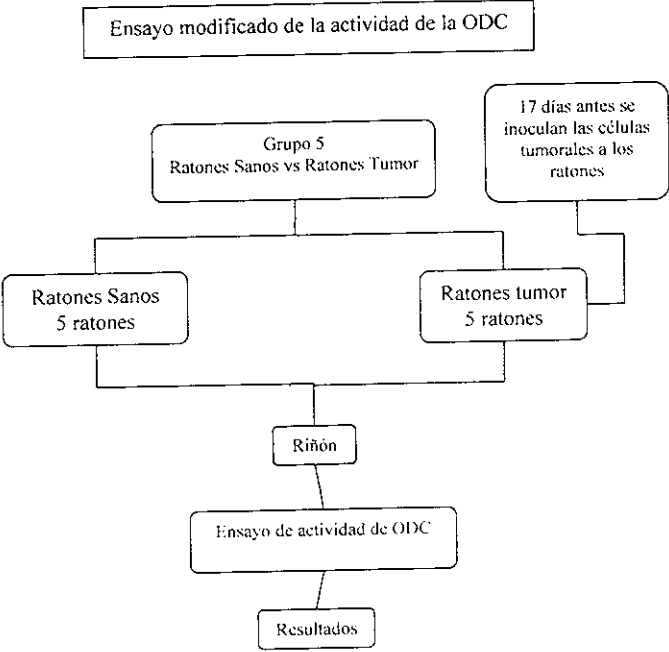
En el grupo 4 se mantienen las condiciones más adecuadas para los diferentes tipos de tejidos (mesotelio intestino riñón), homogenización (mortero) y centrifugación (20,124g/5'/4°C) pero ahora se modifica la temperatura y el tiempo de incubación por lo que se divide en 4 que son el (1) de 37°C/90' de incubación, el (2) es de 42°C/90' de incubación, el (3) es de 37°C/30' de incubación y el (4) y último es de 42°C/30' de incubación. del (1) al (3) (n=3) ratones por condición que corresponden a los tejidos de mesotelio intestino y riñón y en el 4 sólo se tiene una (n=1) ratón que corresponde al tejido de mesotelio: se hace el ensayo de actividad y su medición. Para posteriormente analizar los resultados.



Flujograma 5. Muestra los cambios del experimento 4 con respecto al experimento 1,2,3 y el ensayo de Calvo-Méndez

En el grupo 5 se siguió el protocolo ya modificado de Calvo-Méndez [tejido (Riñón), homogenización (mortero), centrifugación (20.124g/5'4°C) temperatura y tiempo de incubación (42°C/90')]. Se dividió en 2 grupos ratones sanos y ratones con linfoma para determinar si la ODC es un buen biomarcador de tumor en el tejido de riñón, por lo que previamente en el día cero a los ratones con linfoma de se les inoculó vía i.p. 2×10^4 células I.5178Y en condiciones asépticas y se sacrificaron al día 17 de evolución del tumor por dislocación cervical. Se obtuvo muestra de riñón y se homogenizó la muestra por maceración en mortero con amortiguador Tris-HCl 100 mM a pH 8.0 en un cuarto frío a 4°C. Después, dicha muestra se centrifugó a 20.124g/5'4°C. Se extrajo el sobrenadante (muestra) y se colocó en un matraz con PLP 0.2

mM, DTT 2 mM, Tris y L-(1-C¹⁴) Ornitina como sustrato con un papel filtro con KOH 5N que atrapa al CO₂ el cual es un subproducto metabólico de la reacción. Se incubó a 42 °C durante 90 min. El papel filtro se removió, se secó a 60 °C y se colocó en viales para posteriormente cuantificar la cantidad de CO₂ (CPM) en un contador de centelleo (Beckman). Se analizaron los resultados del ensayo.



Flujograma 6. Muestra como se elaboro el experimento 5 para determinar si el tejido de riñón es un buen biomarcador tumoral ya con las modificaciones del protocolo de Calvo-Méndez.

7.6. Pruebas estadísticas

Los resultados finales del grupo 1 al 4 se analizaron por medio de inferencia y los del grupo 5 con el paquete estadístico minitab versión 14, aplicando la prueba t de Student para comparar 2 medias muestrales independientes.

8. RESULTADOS

8.1. Grupo 1 (Tejidos)

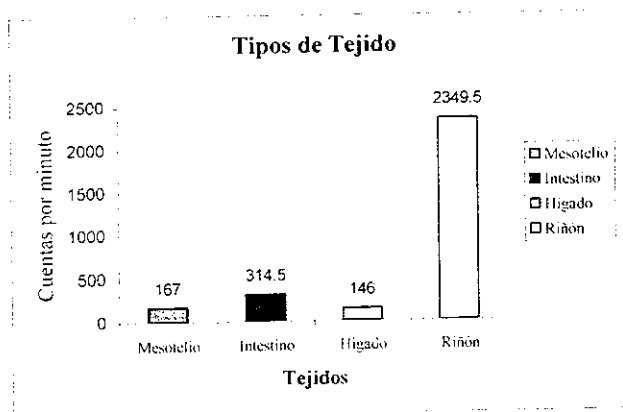
En el grupo 1 se obtuvieron diferencias en las concentraciones de CO₂ en cuentas por minuto entre los diferentes tejidos del estudio.

Los tejidos fueron procesados como se indica en materiales y métodos.

Se observa que el tejido de mayores cuentas por minuto (cpm) de CO₂ fue el riñón y el que menor cpm expuso fue hígado (gráfica 1.1).

Tejidos	Cuentas por minuto
Mesotelio	167
Intestino	314.5
Hígado	146
Riñón	2349.5

Tabla 1. Cuentas por minuto en los diferentes tejidos obtenidos de ratones BALB/c



Gráfica 1. Los tejidos fueron obtenidos de ratones BALB/c y agrupados según materiales y métodos. Los valores se expresan en cpm según la técnica radiométrica.

8.2. Grupo 2 (Métodos de Homogenización)

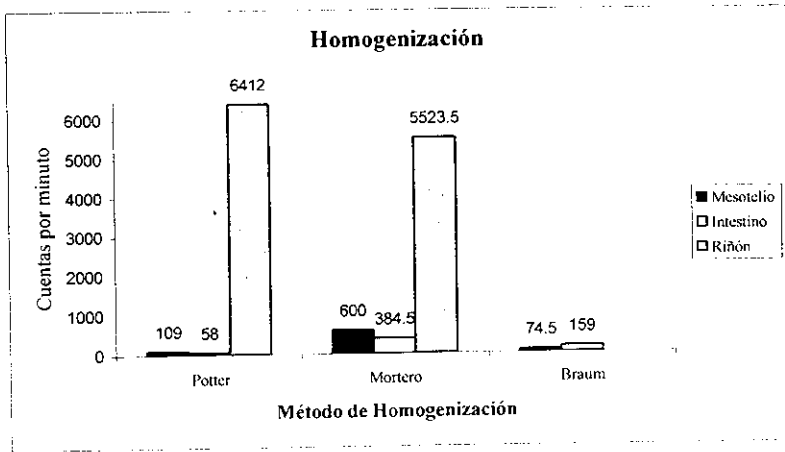
El método Braun de homogenización se utilizó originalmente en el protocolo de Calvo-Méndez, el cual presentó bajo rendimiento tanto en mesotelio como en intestino por lo que se decidió no proceder con riñón por optimización de recursos.

El método Potter de homogenización presentó el más alto rendimiento en riñón, en cambio en mesotelio e intestino el rendimiento fue bajo. Además, dicho método es laborioso, por lo que no se considero una opción adecuada, en caso de procesar grandes cantidades de células.

La homogenización con mortero fue la que presentó mayores ventajas ya que es el más rápido y sencillo de elaborar. Presenta un alto rendimiento en todos los tejidos utilizados.

Tejidos	Braun	Potter	Mortero
Mesotelio	74.5	109	600
Intestino	159	58	384.5
Riñón	/	6412	5523.5

Tabla 2. Respuesta de los diferentes tejidos a la Homogenización, los valores representan las cpm para c/tipo de muestra.



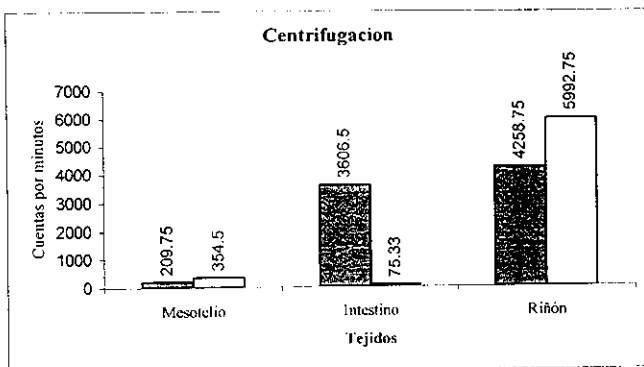
Gráfica 2. Los tejidos son de raton BALB/c y agrupados según materiales y métodos . Los valores se expresan en cpm según la técnica radiométrica.

8.3. Grupo 3 (Centrifugación)

El tejido renal es el que presenta una mejor respuesta a la centrifugación, siendo la de 45,279g/30'/4°C la mejor, Sin embargo en la centrifugación a 20,124g/5'/4°C se obtuvo una respuesta más uniforme en todos los tejidos y representa una mejor opción por el poco tiempo empleado en la centrifugación.

Tejidos	20,124g/5'/4°C	45,279g/30'/4°C
Mesotelio	209.75	354.5
Intestino	3,606.5	75.33
Riñón	4,258.75	5,992.75

Tabla 3. Respuesta de los diferentes tejidos a la centrifugación, los valores representan las cpm para c/tipo de muestra.



Grafica 3. Respuesta en cpm según las condiciones de centrifugación, en gris están las de 20,124g/5'/4°C y las de blanco son las que se centrifugaron a 45,279g/30'/4°C

8.4. Grupo 4 (Temperatura y Tiempo de Incubación)

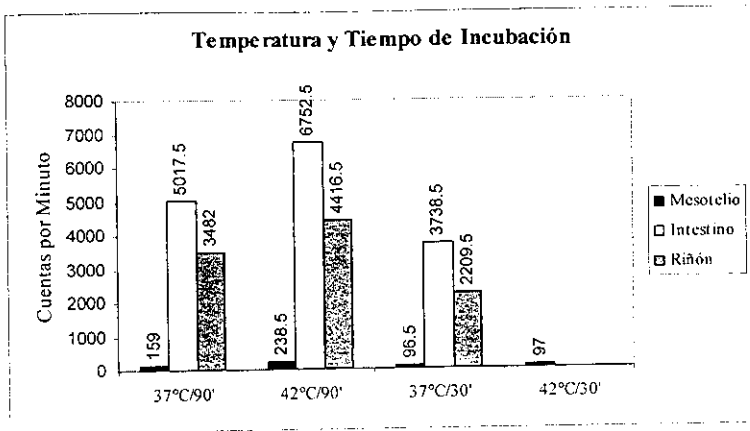
En la temperatura y tiempo de incubación el mayor rendimiento se obtuvo en intestino y riñón en todas las condiciones aunque el intestino tiene una mejor respuesta.

El mayor rendimiento se obtuvo a 42°C/90' en todos los tejidos y la de 37°C/90' fue la segunda mejor.

En la condición de 42°C/30' no se realizó en los tejidos de intestino y riñón ya que en mesotelio no se observó diferencia con respecto a la condición de 37°C/30'.

Tejidos	37°C/90'	42°C/90'	37°C/30'	42°C/30'
Mesotelio	159	238.5	96.5	97
Intestino	5017.5	6752.5	3738.5	/
Riñón	3482	4416.5	2209.5	/

Tabla 4. Valores en cpm en las distintas condiciones de Temperatura y tiempo de incubación



Grafica 4. Los tejidos fueron obtenidos de ratones BALB/c y agrupados según materiales y métodos. Respuesta en cpm según las condiciones de Temperatura y tiempo de incubación

8.5. Grupo 5 (Ratones sanos y con linfoma)

Para corroborar la eficiencia de la técnica propuesta en este estudio, se utilizó el modelo de ratón BALB/c con linfoma murino L5178Y. Se consideró la cantidad de CO₂ liberado como parámetro para medir la actividad de la ODC, a partir de tejido de riñón en 2 grupos de ratones, el primer grupo conformado por los ratones sanos con y el segundo grupo conformado por ratones con linfoma.

Tejido	Sanos	Linfoma
Riñón 1	673.5	808.5
Riñón 2	1168.5	3462.5
Riñón 3	1522	3429
Riñón 4	1719	3686.5
Riñón 5	1242	6471

Tabla 5. Se muestran los datos empleados en la prueba estadística de T de Student con una P= 0.009

Se aplicó la prueba de t de Student para comparar 2 medias muestrales independientes, es decir, para comparar la media de la concentración de CO₂ en el grupo de ratones con linfoma, contra la media de la concentración de CO₂ de ratones sanos.

Hipótesis de Trabajo:

Existe una diferencia en la concentración de CO₂ entre el grupo de ratones sanos y el grupo de ratones con linfoma.

Ho : Las medias entre los grupos son iguales

Ha: Las medias entre los grupos son diferentes

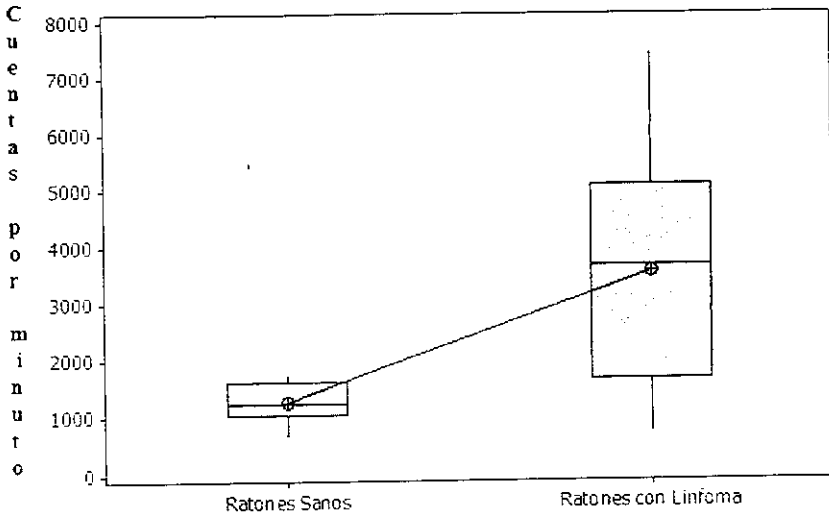
De acuerdo con lo esperado, se encontraron diferencias significativas entre las medias de ambos grupos de estudio con una p menor a 0.01 siendo el grupo de ratones con linfoma el que presentó mayor cantidad de CO₂ liberado y por ende mayor actividad de ODC.

Este modelo se empleó para evaluar la eficiencia de la técnica radiométrica en la determinación de la actividad de la ODC a partir de tejido de riñón en ratones BALB/c según la técnica descrita en materiales y métodos.

Prueba T de Student para comparar 2 medias muestrales				
	N	Media	Desv.est.	Error estándar
Ratones con Linf	10	3572	2145	678
Ratones Sanos	10	1265	378	120
Diferencia = μ (Ratones con Linfoma) - μ (Ratones Sanos)				
Estimado de la diferencia: 2306.75				
95% CI de diferencia: (1748.99, 3864.51)				
T = 3.35 P-Value = 0.009 DF = 9				

Tabla 6. Se muestran los resultados de la prueba T de Student para comparar ratones con linfoma y ratones sanos

Diferencia entre medias de ratones sanos y ratones con linfoma



Gráfica 5. La figura muestra las diferencias entre las medias de los diferentes grupos de estudio. también se muestra que hay una mayor desviación estándar en el grupo de linfoma con respecto al grupo de ratones sanos.

9. DISCUSIÓN

A pesar de que ya han transcurrido más de cuatro décadas desde la utilización de los primeros contadores de centelleo líquido, las técnicas de centelleo líquido no han quedado obsoletas. Más bien al contrario, con el tiempo han ido ganando aceptación ⁴⁷. La técnica radiométrica es utilizada por excelencia, en la determinación de la actividad de ODC, ya que es relativamente fácil de elaborar, es útil para análisis tanto *in vitro* como *in vivo* y se adapta específicamente al análisis de la actividad de la ODC. Sin embargo, una de sus principales limitantes es la manipulación de radioactividad afortunadamente se emplea un radioisótopo con muy poca penetración (¹⁴C) y que se encuentra prácticamente en todos los ambientes. ¹.

El contador de centelleo líquido permite la detección de cualquier tipo de radiación: alfa, beta o gamma, por lo que gracias a la reacción específica de ODC sobre el grupo carboxilo de la ornitina marcada con ¹⁴C y desechado en forma de ¹⁴CO₂ que es capturado por un papel filtro impregnado de KOH, posteriormente puede ser cuantificado y relacionado con la actividad de la enzima en una forma eficiente, rápida y sencilla, dado que es directamente proporcional.

El protocolo para medir la actividad de ODC se podría dividir para su mejor comprensión en dos grandes pasos que son preparación de los tejidos para la determinación de la actividad de ODC y el segundo, el análisis de las muestras. En el primer paso se realizaron modificaciones al protocolo original de Calvo-Méndez, para proporcionar las condiciones óptimas para la reacción enzimática, al modelo propuesto en este estudio, la segunda no fue modificada debido a que solamente implica la valoración y cuantificación del subproducto (¹⁴CO₂) de la reacción.

Las modificaciones que se hicieron fueron en el método de homogenización, y en las condiciones de centrifugación, temperatura y tiempo de incubación, así como tipo de muestra (tejido).

A la hora de elegir el tipo de tejido se analizaron los resultados obtenidos por Reynoso (2004)⁴⁹ en el que se indica que la mayor concentración de PAs se encuentra en mesotelio, intestino, hígado, riñón en el modelo de ratón BALB/c y que los niveles de las PAs varía por el desarrollo de tumor. Y se encontró que el tejido que presentaba una actividad más elevada y constante fue riñón por lo que se piensa que la concentración de PAs en los otros tejidos se debe al transporte extracelular de las PAs.

En base a esta observación considero que el mejor tejido para determinar la actividad de ODC es riñón, dado que presentó una mayor cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ liberado por lo que se expone dicho tejido como un biomarcador de la progresión del cáncer en el modelo de ratón BALB/c con linfoma L5178Y.

Los procedimientos de homogenización son muy diversos, de los cuales destacan la sonicación, el uso de detergentes y diversos instrumentos homogenizadores.

El uso de sonicador no es viable para esta técnica ya que es laborioso, consume mucho tiempo y el equipo que requiere puede ser muy costoso así como la elevación de la temperatura que se produce al exponer las muestras por tiempos prolongados al ultra sonido. El uso de detergentes puede alterar la actividad de ODC por lo que decidimos utilizar instrumentos para la homogeneización.

En la técnica con Braun que es la técnica utilizada por el protocolo de Calvo-Méndez las muestras no tuvieron un gran rendimiento y necesita de un equipo con el cual no se cuenta en nuestro laboratorio, se optó por utilizar una técnica más factible para homogenizar nuestras muestras.

Nosotros encontramos que el método con Potter tuvo un rendimiento aceptable tanto en riñón como en mesotelio e intestino, este método tuvo dificultades para ser realizado porque cada muestra requería de un homogenizador Potter para ser macerado o en su defecto que cada una

de las muestras que fuera procesada se tuviera que lavar el tubo ya que quedaban demasiados residuos.

Según los resultados obtenidos, así como las dificultades técnicas que se presentaron se puede sugerir que el método más eficiente de manera general para la homogeneización es el mortero por su economía en el uso de grandes cantidades de muestras homogenizadas.

En la técnica de mortero a comparación de la técnica de braum se obtuvo un mejor rendimiento y en comparación con Potter fue más fácil de elaborar así como también se obtuvieron rendimientos más constantes en todos los tejidos, además Potter es menos práctico cuando se tienen que procesar gran cantidad de muestras. La única dificultad que presentó el mortero fue la elevación de la temperatura por la fricción de la maceración, pero se solventó el problema fácilmente realizándolo en un cuarto frío con una temperatura de 4°C o bien se puede solventar utilizando hielo fuera del mortero en el proceso de maceración.

En la centrifugación la finalidad fue simplemente extraer la enzima de los restos celulares que no habían sido destruidas por la maceración, así como de separar algunos organelos y macromoléculas, para que no causaran un error en la reacción. Por lo que se utilizó la técnica de centrifugación diferencial, cuyo principio fundamental es la colocación de partículas materiales más densas que el medio que las rodea en un campo gravitacional, las de diferente tamaño y forma viajarán hacia el fondo del tubo de la centrifuga a diferentes velocidades. Por lo que se empleó dos formas de centrifugar diferentes de las cuales la de 45.279g/30'4°C fue la que presentó mejor respuesta en riñón; pero no en mesotelio e intestino y en la de 20.124g/5'4°C se obtuvieron resultados constantes además cualquiera de las dos cumplen con formar un fraccionamiento o separación aceptable. Los resultados sugieren la centrifugación 20.124g/5'4°C ya que evita la pérdida de tiempo a la hora de elaborar nuestro protocolo.

En cuanto a la estandarización de la temperatura se utilizó el valor más extremo en el que trabajan las proteínas que es de 42°C y la temperatura considerada por el protocolo de Calvo-Méndez que es de 37°C, el cual demostró que la temperatura de 42°C no desnaturalizó a la proteína por el contrario provocó una mejor actividad de la misma. Así mismo se utilizaron diferentes tiempos de incubación con las diferentes temperaturas y se observó que a 30' se obtuvo una menor respuesta que a 90' lo que sugiere que a 42°C /90' es la condición más adecuada para este procedimiento ya que cumple con nuestras expectativas.

Para determinar si realmente la ODC es útil como biomarcador de tumor se incluyó un último grupo conformado tanto por ratones sanos, como por ratones con linfoma y se encontró una diferencia significativa ($P=0.001$) respecto a este parámetro de medición. Es decir, los ratones con linfoma presentaron mayor actividad de ODC en tejido de riñón en comparación con los ratones sanos. Lo que parece ser un mecanismo de inducción del tumor sobre el metabolismo de las PAs en los tejidos sanos.

Debido a las observaciones anteriores cree que la técnica radiométrica propuesta en este estudio para determinar las diferencias de la actividad de ODC en ratones sanos como en ratones con linfoma, en diversos tejidos, ha mostrado ser una opción viable y con un rendimiento satisfactorio.

10. CONCLUSIONES

Con la técnica radiométrica es factible determinar la actividad de ODC en tejidos de ratón.

Se determinó por los resultados obtenidos que las condiciones óptimas para realizar el ensayo son:

El tejido de riñón es adecuado para medir la actividad de ODC en el modelo de ratón BALB/c, de los analizados en el presente estudio.

La Homogenización con mortero, centrifugación a $20,124g/5'/4^{\circ}C$ y la temperatura y tiempo de incubación óptimos fueron de $42^{\circ}C$ durante $90'$.

En cuanto al experimento de ratones sano y con tumor se encontró que el riñón es un buen tejido para medir la evolución del tumor, ya que sí hay diferencias significativas entre las medias de los ratones con tumor y sin tumor.

11. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se logró estandarizar la técnica radiométrica descrita por Calvo-Méndez a los tejidos de ratón BALB/c (mesotelio, intestino, riñón), siendo el riñón el de mejores resultados por lo que nosotros consideramos que es el mejor tejido para realizar el ensayo de actividad enzimática de la ODC y utilizarlo como un buen bioindicador para determinar la evolución y implicación o presencia de la actividad tumoral.

Esta técnica nos permite una mejor certeza de la bioquímica de las poliaminas y por ende de la evolución de tumores. Y por lo que se propone utilizarla como una herramienta básica, en el Laboratorio de Biomarcadores y Genética Molecular, para nuestros futuros estudios.

12. Bibliografía

1. Badolo L., Berlaimont V., Helson-Cambier M., Hanocq y Dubois J. Simple and rapid enzymatic assay of ornithine decarboxylase activity. *Talanta*. 48: 127-134. 1999.
2. Pitkanen L. T., Heiskala M. y Andersson L. C. Expression of a novel human ornithine decarboxylase-like Protein in the central Nervous System and Testes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 287: 1051-1057. 2000.
3. Emmerson D. A., Anthony N. B., Foster D.N. y Nestor K. E. Nucleic Acid concentrations and Ornithine decarboxylase activity in tissues from three lines of turkeys. *Poultry Science*. 76: 217-226. 1997.
4. Thomas M. Devlin. Enzimas: clasificación cinética y control capítulo 4. en: *Bioquímica* . Vol. I . Tercera Edición. Editorial Reverte, S.A. España. 1999.
5. Bowlin T.L., McKown B.J. y Sunkara P.S. Ornithine Decarboxylase Induction and Polyamine Biosynthesis Are Required for the Growth of Interleukin-2-and Interleukin—3-Dependent Cell Lines. *Cellular Immunology* 98: 341-350. 1986.
6. Jackson L. K., Brooks H. B., Osterman A. L., Goldsmith Elizabeth y Margaret P. A. Altering the reaction specificity of Eukaryotic Ornithine decarboxylase. *Biochemistry*. 39: 11247-11257. 2000.
7. Choi Kyoung Suk, Suh Young Ho, Kim Won-Ho, Holey Tae y Jung Myeong Ho. Stable siRNA-mediated silencing of antizyme inhibitor : regulation of Ornithine decarboxylase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 328: 206-212. 2005.
8. Pegg A. E. Regulation of Ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* As Manuscript: R500031200. 1-8. 2006.

9. Tsirka S. Y Coffino P. Dominant negative mutants of Ornithine Decarboxylase. *The J. of Biol Chem.* 267(32): 23057-23062. 1993.
10. Gilad G. M., Gilad V. H. y Rabey J. M. Arginine and Ornithine decarboxylation in rodent brain : coincidental changes during development and after ischemia. *Neuroscience letters.* 216: 33-36. 1996.
11. David M, Morgan.L. Polyamine protocols. Humana Press. Totowa, New Jersey. 1998.
12. Shantz L. M. y Pegg A. E. Translational regulation of Ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 31: 107-122. 1999.
13. Murakami Yasuko, Matsufuji Senya, Hayashi Shin-ichi, Tanahashi Nobuyuki y Tanaka Keiji. Degradation of Ornithine decarboxylase by the 26s Proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 267: 1-6. 2000.
14. Urdiales J. L., Medina M. A. y Sánchez-Jiménez. Polyamines metabolism revised. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology.* 13: 1015-1019. 2001.
15. Mc Cann P., Pegg E. A., Sjoerdsma A. Inhibition of polyamine metabolism. Academic press. Orlando, Florida. 1987.
16. Wallace H. M. The physiological role of the polyamines. *European Journal of Clinical Investigation.* 30: 1-3. 2000.
17. Jeevanandam M., Holaday N. J., Begay C. K. y Petersen S. R. Nutritional efficacy of a spermidine supplemented diet. *Nutrition.* 13(9): 788-794. 1997.
18. Wallace H. M. The physiological role of the polyamines. *European Journal of clinical Investigation.* 30: 1-3. 2000.
19. Babbar N. y Gerner E. W. Polyamines as modifiers of genetic risk factors in human intestinal cancers. *Biochem. Soc. Trans.* (31) 2: 388-392. 2003.

20. Gallardo M., Matilla, A., Muñoz de Rueda, P. y Sanchez Calle, I.M. Papel de las poliaminas en el crecimiento y desarrollo. *Ars Pharm.* 37 (1): 17-27, 1996.
21. Nishioka K. Circulating polyamines as biological markers for cancer. En: *Polyamines in cancer: basic mechanisms and clinical approaches*. Pag. 233-245. Editorial. Chapman & Hall. 1996.
22. Cañizares F., Salinas J., de las Heras M., Diaz J., Tovar I., Martinez P. y Peñafiel R. Prognostic value of ornithine decarboxylase and polyamines in human breast cancer: Correlation with clinicopathologic parameters. *Clinical Cancer Research*. 5: 2035-2041. 1999.
23. Tamori A., Nishiguuchi S., Kuroki T., Seki S., Kobayashi K., Kinoshita H. y Otani S. Relationship of ornithine decarboxylase activity and histological findings in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 20: 1179-1186. 1994.
24. Almurd J.J., Oliveria M. A., Kern A.D., Grishin N. V., Phillips M. A., y Hackert. M. L. Crystal structure of human Ornithine Decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *J. Mol. Biol.* 295: 7-10. 2000.
25. Casero Jr. R. A., Wang Y., Stewart T. M., Devereux W., Hacker A., Smith R. y Woster P.M. The role of polyamine catabolism in anti-tumour drug response. *Biochemical Society Transactions*. 31 (2): 361-365. 2003.
26. Wang Y., Devereux W., Woster P. M., Stewart T. M., Hacker A. y Casero Jr. R. A. Cloning and characterization of a human polyamine oxidase that is inducible by polyamine analogue exposure. *Cancer Res*. 61: 5370-5373. 2001.
27. Zhu Meng-yang, Lyo Abiye, Piletz John E. y Regunathan Soundar. Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for agmatine. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1670: 157-164. 2004.

28. Coleman Catherine S. HU Guirong y Pegg A. E. Putrescine biosynthesis in mammalian tissues. *Biochem. Journal.* 379: 849-855. 2004.
29. NCBI.GenBank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=18263. 16/05/06. 1:33 pm.
30. Cohen S. S. Introduction to the Polyamines. Prentice-Hall, inc. Englewood Cliffs, New Jersey: 1-2. 1971.
31. Poulin R., Lu L., Ackermann B., Bey P. y Pegg A. E. Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alfa-difluoromethylornithine. *J. Biol. Chem.* 267: 150-158. 1992.
32. Pegg A. E. y Williams-Ashman, H. G. en *Polyamines en biology and medicine* (Morris, D.R. y Marton, L. J., Editores): 3-42. Marcel Dekker, Nueva York. 1981.
33. Meyskens Jr. F. L. y Gerner E. W. Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. *Clinical Cancer Research.* 5: 945-951. 1999.
34. Takahashi Y., Mai M. y Nishioka K. α - difluoromethylornithine induces apoptosis as well as anti-angiogenesis in the inhibition of tumor growth and matastasis in a human gastric cancer model. *Cancer Int. J.* 85: 243-247. 2000.
35. Ivanov I. P., Rohrwasser A., Terreros D. A., Gesteland R. F. y Atkins J. F. Discovery of a spermatogenesis stage-specific ornithine decarboxylase antizyme: Antizyme 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(9): 4808-4813. 2000.
36. NCBI.GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene>. 16/05/06. 1:50 pm.
37. NCBI.GenBank. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=18245. 16/05/06. 2:00 pm.

38. NCBI.GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&db=t&Dopt=s&uid=34324>. 16/05/06. 2:10 pm.
39. Feith D. J., Shantz L. M. y Pegg A. E. Targeted antizyme expression in the skin of transgenic mice reduces tumor promoter induction of ornithine decarboxylase and decreases sensitivity to chemical carcinogenesis. *Cancer Research*. 61: 6071-6081. 2001.
40. Ivanov I. P., Gesteland R. F. y Atkins J. F. A second mammalian antizyme: conservation of programmed ribosomal frameshifting. *Genomics* 52: 119-129. 1998.
41. Kobayashi M., Xu Y. J., Samejima K., Goda H., Niitsu M., Takahashi M. y Hashimoto Y. Fate of orally administered ¹⁵N-labeled polyamines in rats bearing solid tumors. *Biol. Pharm. Bull.* 26(3): 285-288. 2003.
42. Murakami Y., Matsufuji S., Hayashi S., Tanahashi N. y Tanaka K. Degradation of Ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 1-5. 2000.
43. Wang Y. y Bachrach U. Luminescence-based test for determining Ornithine decarboxylase activity. *Anal Biochem.* 287(2): 299-302. 2000.
44. Stella E., Tsirka, Christoph W., Turck y Philip C. Multiple active conformers of mouse ornithine decarboxylase. *Biochem J.* 293: 289-295. 1993.
45. Calvo-Mendez C., Martinez-Pacheco M. y Ruiz-Herrera J. Regulation of Ornithine Decarboxylase Activity in *Mucor bacilliformis* and *Mucor rouxii*. *Experimental Mycology*. 11: 270-277. 1987.
46. Ramírez Flores Ana Gabriela. Efecto del inmunomodulador T-Activina sobre la respuesta inmune celular de ratones inmunosuprimidos con el linfoma L5178Y. Tesis para obtener el grado de Doctor en ciencias fisiológicas. 2004.

47. Grau C. y Agustin. Aplicacion de la técnica de centelleo en fase liquida a la calibración de mezclas de radionucleidos por descomposición espectral.
www.ucm.es/eprints/3072/.2002. 18/06/06. 3:28 pm.
48. Jean Paul Buts. Polyamines in milk. <http://www.pediatrie.be/POLINMIL.htm>. 20/06/06
8:28
49. Reynoso O. R. Las poliaminas como bioindicadores del crecimiento neoplásico y el efecto de *Bursera fagaroides* sobre su metabolismo. Tesis para obtener el grado de Doctor en ciencias biomédicas orientado a inmunología. 2004.

BIBLIOTECA CUCBA