

# **Poliamines en la sang i l'intestí:**

estudis sobre els nivells eritrocitaris i  
el metabolisme en la mucosa intestinal

**Toni Segovia-Silvestre**



Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona 2002

## **Tesi doctoral**

Programa de doctorat Medicina Interna. Any de presentació 2002

### **Poliamines en la sang i l'intestí:**

estudis sobre els nivells eritrocitaris i  
el metabolisme en la mucosa intestinal

Memòria presentada per Toni Segovia-Silvestre per optar al grau de Doctor

Tesi doctoral realitzada al Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular de l'Hospital  
Universitari Vall d'Hebron sota la direcció de la Dra. Mireia Farriol i Gil.

Tesi adscrita al Departament de Medicina Interna, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de  
Barcelona. Tutor: Jaume Vilaseca i Momplet.

**El Tutor:**

**L'interessat:**

**La Directora de Tesi:**

Jaume Vilaseca i Momplet

Toni Segovia-Silvestre

Dra. Mireia Farriol i Gil

# Índex

<b>Llista de taules</b> .....	x
<b>Llista de figures</b> .....	xi
<b>Agraïments</b> .....	xii
<b>Abreviatures</b> .....	xiii
<b>1 Introducció</b> .....	1
1.1 Poliamines.....	1
1.1.1 Descobriment.....	1
1.1.2 Estructura i propietats.....	2
1.1.3 Funcions fisiològiques.....	3
1.1.3.1 Interacció amb l'ADN.....	3
1.1.3.2 Síntesi d'ADN i proteïnes.....	4
1.1.3.3 Creixement cel.lular.....	5
1.1.3.4 Apoptosi.....	5
1.1.4 Metabolisme de les poliamines en mamífers.....	7
1.1.4.1 Biosíntesi.....	7
1.1.4.2 El cicle d'interconversió de la putrescina.....	9
1.1.4.3 Catabolisme de poliamines.....	10
1.1.5 Les poliamines en la sang.....	12
1.1.6 Les poliamines en l'intestí.....	13
1.1.7 Les poliamines i el càncer.....	14
1.2 L'ornitina descarboxilasa.....	16
1.3 L'antiènzim.....	19
1.4 L'inhibidor de l'antiènzim.....	21
1.5 La síndrome de l'intestí curt.....	22
<b>Objectius del present estudi</b> .....	25
<b>2 Materials i mètodes</b> .....	29
2.1 Materials.....	29
2.1.1 Reactius i instrumental.....	29
2.1.2 Cèl.lules.....	34
2.1.3 Subjectes.....	36
2.2 Mètodes.....	41
2.2.1 Posada al punt d'un mètode d'HPLC per poliamines.....	41

2.2.1.1	Tractament de la mostra.....	42
2.2.1.1.1	Tractament de mostres de sang.....	42
2.2.1.1.2	Tractament de cultius cel.lulars.....	47
2.2.1.1.3	Tractament de la mucosa intestinal humana.....	48
2.2.1.2	Derivatització.....	50
2.2.1.2.1	Fonament.....	50
2.2.1.2.2	Optimització de la derivatització.....	51
2.2.1.2.3	Proves d'estabilitat dels derivats QAC.....	53
2.2.1.3	Separació cromatogràfica.....	54
2.2.1.3.1	Fonament.....	54
2.2.1.3.2	Equip instrumental.....	55
2.2.1.3.3	Identificació dels pics cromatogràfics.....	59
2.2.1.3.4	Optimització de la separació.....	62
2.2.1.4	Detecció per fluorescència.....	71
2.2.1.4.1	Propietats fluorescents dels QAC- poliamines.....	71
2.2.1.4.2	Espectrofluorímetre.....	72
2.2.1.5	Anàlisi i tractament de dades.....	73
2.2.2	Altres mètodes.....	75
2.2.2.1	Cultiu de cèl.lules.....	75
2.2.2.2	Extracció de mostres intestinals humanes.....	76
2.2.2.3	Tractament estadístic dels valors de referència.....	76
2.2.2.4	Peroxidació lipídica.....	78
2.2.2.5	Proliferació cel.lular.....	78
2.2.2.6	Activitat enzimàtica ornitina decarboxilasa.....	79
2.2.2.7	Activitat enzimàtica diamina oxidasa.....	82
2.2.2.8	ARN missatger de l'ornitina decarboxilasa.....	83
2.2.2.8.1	ARNm-ODC per anàlisi Northern blot.....	84
2.2.2.8.2	ARNm-ODC per anàlisi Northern-ELISA.....	84
2.2.2.8.3	ARNm-ODC per PCR a temps real.....	85
2.2.2.9	ARN missatger de l'antienszim.....	86
2.2.2.10	Proteïna de l'antienszim.....	87
2.2.2.11	Proteïna de la ciclina D1.....	88
2.2.2.12	Expressió de proteïnes recombinants AZI.....	88
2.2.2.13	Proteïna total.....	89
2.2.2.14	Anàlisi estadística de dades experimentals.....	89

### **3 Resultats..... 93**

3.0	Control de qualitat del mètode de quantificació de poliamines.....	93
3.0.1	Linealitat i corbes de calibratge.....	93
3.0.2	Significació dels coeficients de correlació i de determinació.....	95
3.0.3	Precisió.....	95
3.0.4	Exactitud.....	96

3.0.5	Sensibilitat.....	97
3.1	Poliamines en la sang.....	99
3.1.1	Establiment d'uns valors de referència de poliamines en sang...	99
3.1.1.1	Partició dels valors de referència.....	99
3.1.1.2	Poliamines totals en sang.....	103
3.1.1.3	Inspecció de la distribució dels valors de poliamines...	104
3.1.1.4	Establiment dels valors de referència.....	106
3.1.1.5	Equivalència de les unitats de concentració de PA.....	107
3.1.1.6	Relació de les PA amb els paràmetres eritrocitaris.....	108
3.1.2	Poliamines en sang en pacients amb una resecció intestinal....	109
3.1.3	Efecte antiperoxidatiu de les poliamines en els eritròcits.....	110
3.2	Poliamines en el budell.....	111
3.2.1	Poliamines en la síndrome de l'intestí curt.....	111
3.2.1.1	Nivells d'ornitina i poliamines en la mucosa intestinal..	111
3.2.1.2	Activitat ornitina descarboxilasa.....	112
3.2.1.3	ARN missatger de l'ornitina descarboxilasa.....	113
3.2.1.4	Activitat diamina oxidasa.....	114
3.2.2	Poliamines en el càncer colorectal.....	115
3.2.2.1	Paper de la putrescina exògena en el creixement de cèl.lules CT-26.....	115
3.2.2.2	Expressió de l'antienzim en tumors colorectals.....	118
3.2.2.3	Quantificació de l'ARN missatger de l'ODC en tumors colorectals.....	123
3.3	Activitat ODC en mutants de l'inhibidor de l'antienzim.....	125
<b>4</b>	<b>Discussió.....</b>	<b>129</b>
4.0	Quantificació de poliamines en mostres biològiques.....	129
4.1	Poliamines en la sang.....	129
4.2	Poliamines en l'intestí.....	134
4.2.1	Poliamines en la síndrome de l'intestí curt.....	134
4.2.2	Poliamines en el càncer colorectal.....	136
4.3	Activitat ODC dels mutants A88D, S274R i A88D/S274R AZI.....	142
	<b>Conclusions.....</b>	<b>143</b>
<b>5</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>147</b>
<b>6</b>	<b>Annexes.....</b>	<b>183</b>
6.1	Beques i projectes relacionats.....	183
6.2	Altres publicacions.....	184
6.3	Comunicacions a congressos.....	185

# Lista de taules

<u>1.1</u>	Constants d'equilibri àcides de les poliamines	2
<u>2.1</u>	Reactius de laboratori	29
<u>2.2</u>	Oligonucleòtids per PCR	31
<u>2.3</u>	Característiques dels pacients amb estrès oxidatiu	37
<u>2.4</u>	Dades clíniques del Grup II.A	38
<u>2.5</u>	Dades clíniques del Grup II.B	39
<u>2.6</u>	Característiques del grup III.A	39
<u>2.7</u>	Característiques del grup III.B	40
<u>2.8</u>	Paràmetres de quantificació de les PA en presència d'aminoàcids	51
<u>2.9</u>	Paràmetres de quantificació de les PA en funció de la relació tampó borat vs. reactiu	52
<u>2.10</u>	Reproduïbilitat en la quantificació de 10 solucions d'estàndards de PA analitzades durant un mes	53
<u>2.11</u>	Reproduïbilitat en la quantificació de 5 solucions d'estàndards de PA analitzades durant 2 setmanes	53
<u>2.12</u>	Efecte del tamany de mostra injectada sobre la precisió de les mesures	59
<u>2.13</u>	Mesures de dispersió en el temps de retenció de les PA	59
<u>2.14</u>	Gradient per la separació de PA en fase inversa	63
<u>2.15</u>	Gradient amb un front 10% en acetonitril	65
<u>2.16</u>	Gradient amb un front 13% en acetonitril	66
<u>2.17</u>	Gradient amb un front 15% en acetonitril (I)	67
<u>2.18</u>	Gradient amb un front 15% en acetonitril (i II)	68
<u>2.19</u>	Gradient amb un front 20% en acetonitril	69
<u>2.20</u>	Propietats fluorescents de les QAC-PA	71
<u>3.1</u>	Coeficients de correlació, grau de significació i coeficients de determinació de les corbes de calibratge de les poliamines	95
<u>3.2</u>	Precisió del mètode en la determinació de la putrescina	95
<u>3.3</u>	Precisió del mètode en la determinació de l'espermidina	96
<u>3.4</u>	Precisió del mètode en la determinació de l'espermina	96
<u>3.5</u>	Recuperació de les poliamines en mostres de sang i de cèl.lules CT-26	96
<u>3.6</u>	Intensitats de fluorescència de les poliamines en un blanc d'hidròlisi	97
<u>3.7</u>	Límits de detecció i de quantificació del mètode per a la determinació de poliamines	98
<u>3.8</u>	Estadística descriptiva de les poliamines i dels paràmetres eritrocitaris en un grup de població normal	99
<u>3.9</u>	Distribució de l'espermidina, l'espermina i l'EPD/EPM en la població de referència estratificada en la subclasse edat	100
<u>3.10</u>	Distribució de l'espermidina, l'espermina i l'EPD/EPM en la població de referència estratificada en la subclasse sexe	101
<u>3.11</u>	Distribució de l'espermidina, l'espermina i l'EPD/EPM en la població de referència estratificada en la subclasse tabaquisme	102
<u>3.12</u>	Distribució del total d'espermidina i d'espermina en sang en la població de referència estratificada en la subclasse sexe	103
<u>3.13</u>	Prova de Kolmogorov-Smirnov per les PA en sang de població normal	106
<u>3.14</u>	Prova de Kolmogorov-Smirnov per Ln (espermina)	106
<u>3.15</u>	Correlació lineal entre les poliamines en sang i els paràmetres eritrocitaris	109

<u>3.16</u> Poliamines en sang en pacients amb resecció intestinal	109
<u>3.17</u> Alliberament de malonildialdehid en eritròcits de persones sanes estimulats amb H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en presència de PA	110
<u>3.18</u> Alliberament de malonildialdehid en eritròcits de persones amb estrès oxidatiu en presència d'espermina	110
<u>3.19</u> Concentracions d'ornitina i poliamines en la mucosa intestinal de pacients amb la síndrome de l'intestí curt i jejunostomia	111
<u>3.20</u> Concentracions de poliamines en cèl.lules CT-26 tractades amb putrescina	116
<u>3.21</u> Concentracions de poliamines en biòpsies de mucosa colònica de pacients intervinguts de carcinoma colorectal	122
<u>3.22</u> Característiques dels tumors primaris dels pacients del grup III.A	123
<u>3.23</u> Concentracions d'ARNm-ODC i poliamines en biòpsies de mucosa colònica del grup III.B	124
<u>3.24</u> Activitat ODC en proteïnes recombinants purificades amb columnes HiTrap	126

# Llista de figures

<u>1.1</u>	Representació 3D de les poliamines	2
<u>1.2</u>	Ruta de síntesi de poliamines en mamífers	7
<u>1.3</u>	Síntesi del grup aminopropil	8
<u>1.4</u>	Ruta d'acetilació/oxidació en el cicle d'interconversió de les PA	9
<u>1.5</u>	Metabòlits originats a partir de la desaminació de la putrescina en teixits animals	11
<u>2.1</u>	Etapes del mètode d'HPLC	41
<u>2.2</u>	Mostra de sang tractada amb calor	44
<u>2.3</u>	Mostra de sang tractada amb acetonitril	45
<u>2.4</u>	Corba de valoració d'una mostra de sang tractada amb PCA 3M amb KOH 1,5M	45
<u>2.5</u>	Mostra de sang tractada amb perclòric	46
<u>2.7</u>	Mostra de cèl.lules Caco-2 tractada amb perclòric	48
<u>2.8</u>	Mostra de mucosa de còlon humà	49
<u>2.9</u>	Mostra d'adenocarcinoma de còlon humà	49
<u>2.10</u>	N1,N4-Bis(6-quinolilaminocarbonil)putrescina	50
<u>2.11</u>	N1,N4,N8-Tris(6-quinolilaminocarbonil)espermidina	50
<u>2.12</u>	N1,N4,N9,N12-Tetrakis(6-quinolilaminocarbonil)espermina	50
<u>2.13</u>	Esquema de derivatització	52
<u>2.14</u>	Barreja d'estàndards de PA 15 microm	54
<u>2.15</u>	Bucle de mostra per líquids	57
<u>2.16</u>	Diagrama de flux de l'injector de mostra	58
<u>2.17</u>	Esquema de derivatització	59
<u>2.19</u>	Barreja d'estàndards de PA 15 microm	60
<u>2.20</u>	Mostra de cèl.lules Caco-2 sense addició d'estàndards de PA	60
<u>2.21</u>	Mostra de cèl.lules Caco-2 amb addició d'estàndards de PA	61
<u>2.22</u>	Estàndards resolts en un gradient isocràtic	63
<u>2.23</u>	Representació del gradient per a la separació de PA en fase inversa	64
<u>2.24</u>	Estàndards resolts en un gradient amb un front 10% acetonitril	65
<u>2.25</u>	Estàndards resolts en un gradient amb un front 13% acetonitril	66
<u>2.26</u>	Estàndards resolts en un gradient amb un front 15% acetonitril	67
<u>2.27</u>	Estàndards de PA i AA resolts en un gradient amb un front 15% acetonitril	68
<u>2.28</u>	Estàndards resolts en un gradient amb un front 15% acetonitril	69
<u>2.29</u>	Mostra de caco-2 resolta en un gradient amb un front 20% acetonitril	70
<u>2.30</u>	Mostra de sang resolta en un gradient amb un front 20% acetonitril	70
<u>2.31</u>	Esquema dels components de l'espectrofluorímetre Kontron SFM25	72
<u>2.32</u>	Integració de pics cromatogràfics	73
<u>2.33</u>	Decarboxilació del substrat marcat en l'assaig d'activitat ODC	79
<u>2.34</u>	Linealitat de l'assaig ODC en funció de la quantitat de proteïna ODC E.coli present en l'assaig	81
<u>2.35</u>	Desaminació del substrat marcat en l'assaig d'activitat DAO	82



<u>2.36</u> Equilibri de les formes lineal i cíclica del 4-aminobutanal en fase aquosa	82
<u>2.37</u> Linealitat de l'assaig DAO en funció del temps de reacció.	83
<u>2.38</u> Representació de la fluorescència emesa per nombre de cicle de PCR en el sistema de PCR quantitativa	86
<u>2.39</u> Comparació de les seqüències d'aminoàcids de l'antienzim humà i l'antienzim de ratolí	87
<u>3.1</u> Corba de calibratge del mètode d'HPLC per a la putrescina	93
<u>3.2</u> Corba de calibratge del mètode d'HPLC per a l'espermidina	94
<u>3.3</u> Corba de calibratge del mètode d'HPLC per a l'espermina	94
<u>3.4</u> Distribució de l'espermidina en la sang de població normal	104
<u>3.5</u> Distribució de l'espermina en la sang de població normal	104
<u>3.6</u> Distribució de la relació EPD/EPM en la població normal	105
<u>3.7</u> Correlació entre les unitats de concentració d'espermidina en sang	107
<u>3.8</u> Correlació entre les unitats de concentració d'espermina en sang	108
<u>3.9</u> Activitat ODC en la mucosa intestinal de pacients amb la síndrome de l'intestí curt amb jejunostomia	112
<u>3.10</u> ARNm-ODC en la mucosa intestinal de pacients amb la síndrome de l'intestí curt amb jejunostomia	113
<u>3.11</u> Activitat DAO en la mucosa intestinal de pacients amb la síndrome de l'intestí curt amb jejunostomia	114
<u>3.12</u> Síntesi d'ADN en cèl.lules CT-26 tractades amb putrescina	115
<u>3.13</u> Activitat ODC en cèl.lules CT-26 tractades amb putrescina	117
<u>3.14</u> ARNm-ODC en cèl.lules CT-26 tractades amb putrescina	117
<u>3.15</u> Comparació entre els dos anticossos anti-AZr estudiats respecte a la seva abilitat per reaccionar amb la proteïna humana	118
<u>3.16</u> Anàlisi Western blot de l'antienzim humà en cèl.lules K-562	119
<u>3.17</u> Expressió de l'AZ en cèl.lules Caco-2 i en biòpsies intestinals humanes	119
<u>3.18</u> Mostres d'ARN total del grup III.A resoltes en un gel d'agarosa 1,2%	120
<u>3.19</u> Expressió d'ARNm i proteïna AZ i d'ARNm i activitat ODC en mucosa colònica dels pacients del grup III.A	121
<u>3.20</u> Western blot de la ciclina D1 en pacients del grup III.A	122
<u>3.21</u> Expressió i purificació de proteïnes recombinants A88D, A88D/S274R i S274R AZI	125

# Agraïments

El present estudi es va dur a terme en el Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. Primer de tot vull expressar la meua gratitud a la meua directora de tesi, **Dra. Mireia Fariol i Gil** per introduir-me a l'interessant món de les poliamines i pel seu recolzament durant tots els anys de treball. El nostre projecte s'ha trobat amb dificultats de tota mena i els resultats moltes vegades s'han fet esperar, però una bona col.laboració professional i personal han permès generar tot un recull de dades científiques rellevants.

També vull agrair especialment a la **Dra. Ana Maria Pita i Mercè** la seva decisiva aportació en l'estudi dels pacients amb la síndrome del budell curt. Gràcies a la seva experiència clínica i al respecte que s'ha guanyat a la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge vam poder coordinar un estudi de considerable complexitat, optimitzant els recursos disponibles.

El **Dr. Josep Maria Castellanos** va fer possible posar en marxa la unitat de cromatografia i va compartir amb mi els seus amplis coneixements en bioquímica.

Vull donar les gràcies al **Dr. Simón Schwartz i Riera**, director del CIBBIM, pel seu suport al meu projecte de tesi. Agraïxo al **Dr. Jaume Vilaseca i Momplet** la seva feina com a tutor per l'UAB. Al personal del CIBBIM vull agrair-li l'esperit de col.laboració i les bones estones que vaig compartir amb ells al laboratori. A tot el departament de Bioquímica de l'Hospital Vall d'Hebron vaig trobar moltíssim ajut i un exemple de com, malgrat disposar d'unes condicions laborals difícils, tothom (personal de neteja, auxiliars d'infermeria, infermeres, becaris, doctors i personal administratiu) és solidari i fa sentir al nouvingut com a casa seva. Així mateix, l'equip d'extraccions va fer una feina fantàstica per construir el grup de normalitat.

El **Dr Jonas Nilsson** i el **Professor Olle Heby** van satisfer la meua aspiració d'aprofundir en el coneixement de l'antienzim. Al laboratori del CMB de la Divisió de fisiologia de la Universitat d'Umeå em van oferir un ambient de treball òptim per guanyar habilitat en tècniques de biologia molecular.

**Xavi Orta** i **Yusi Venereo**, companys directes de feina, són dues persones que m'estimo i a les quals admiro sense més. Xavi "l'home ARN" és el responsable de que poguessim mesurar el missatge de l'ODC en els nostres experiments.

Aquest és un bon lloc per agrair als amics la seva amistat: **Tato, Joan, David** (× 2), **Lluís** mai caminareu sols. Els **Segovia** i les **Silvestre**, les **Bruguera**, el **Shillaker**, el **Morillas**, la **Martinez** sempre em van recolzar, i durant la tesi encara més. Menció especial per a la **Carmen**, l'**Antonio** i la **Rosa**. Menció a la memòria d'en **Carmelo Alminyana** i el **José Segovia**: se us troba a faltar.

La **Miriam Frieden Bruguera** és la persona més important de la meua vida. El seu exemple com a treballadora i com a científica, i la possibilitat de compartir el futur amb ella han estat els dos al·licients més forts per tirar endavant aquesta tesi.

# Abreviatures

AA	aminoàcids
AMG	aminoguanidina
AZ	antienzim
AZI	inhibidor de l'antienzim
BrdU	bromodesoxiuridina
CA 19-9	antígen carbohidrat 19-9
Cb	carbencilina
CDC4	ciclina depenent de cinases 4
CDCD1	ciclina depenent de cinases D1
CEA	antígen carcinoembrionari
CHBGCM	concentració d'hemoglobina corpuscular mitjana
DAO	diamina oxidasa
DDP	dieta deficient en poliamines
DFMO	$\alpha$ -difluorometilornitina
DMEM	medi d'Eagle modificat per Dulbecco
DT	desviació típica
DVH	distribució del volum d'hematòcrit
ETM	error típic de la mitjana
EDTA	àcid etilentetraamindiacètic
FCE	factor de creixement epidèrmic
GABA	àcid $\gamma$ -aminobutíric
GADPH	gliceraldehid difosfat deshidrogenasa
GLP-2	pèptid tipus glucagon 2
HGB	hemoglobina
HGBCM	hemoglobina corpuscular mitjana
IPTG	isopropiltio- $\beta$ -D-galactòsid
LB	medi Luria-Bertoni
LD	límit de detecció del mètode analític
LQ	límit de quantificació del mètode analític
MDA	malonildialdehid
PAO	poliamina oxidasa depenent de FAD
PBGD	porfobilinogen desaminasa
PVDF	diflorur de polivinilidè
PYY	pèptid tirosina-tirosina
QCHS	6-quinolinilcarbamat de <i>N</i> -hidroxisuccinimidil
QAC	quinolinilaminocarbonil
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
SIC	síndrome del budell curt
SSAT	espermidina/espermina N1-acetiltransferasa
TBA	àcid tiobarbitúric
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
PA	poliamines
VCM	volum corpuscular mitjà
UMA	unitat de masa atòmica

*“The fact that polyamines have been selected at an early stage of evolution and have persisted in all cell types of the organisms which developed in the course of millions of years, is a strong argument in favor of a general physiological significance of the polyamines.”*

Nikolaus Seiler, 1990

# 1 Introducció

## 1.1 Poliamines

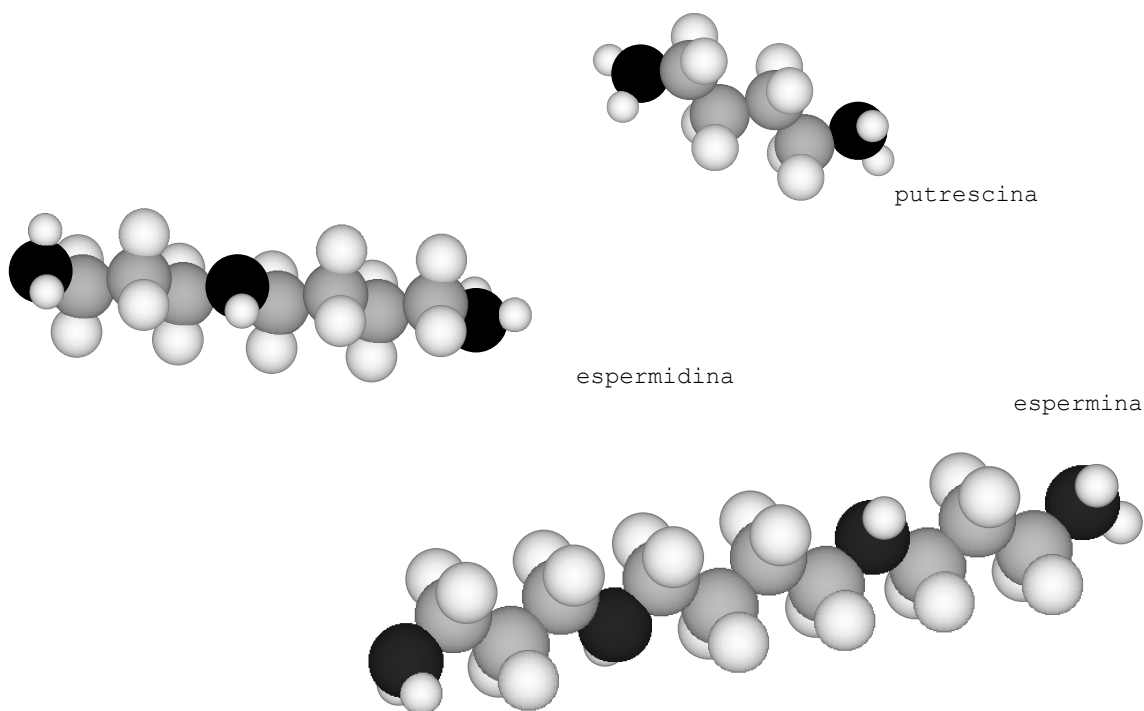
### 1.1.1 Descobriment

Les cèl·lules de tots els organismes contenen petites molècules carregades positivament anomenades poliamines (PA). Encara que les seves funcions no estan completament caracteritzades, les PA es consideren, de forma genèrica, moduladors del creixement i el metabolisme cel·lular.

En una de les cartes que Antoni van Leeuwenhoek va escriure durant 50 anys a la Royal Society de Londres reportant sobre les seves troballes amb el microscopi, l'autor descrivia els espermatozoides humans i feia constar la formació de cristalls en el semen quan es deixa reposar una estona (Leeuwenhoek 1678). Avui dia, sabem que aquells cristalls eren fosfat d'espermina i es considera que aquesta va ser la primera identificació formal de les PA. El fenomen va ser redescobert diverses vegades durant els 200 anys següents i, en cada cas, el descobridor desconeixia aparentment el que altres havien descrit. Vaquelin (1791) va informar d'observacions similars a les de l'estudi original de van Leeuwenhoek. També existeix una referència de Berzelius en el seu *Lehrbuch der Chemie* publicat en 1840. Charcot (1853) va informar de la formació de fosfat d'espermina cristal·lí en mostres de sang riques en leucòcits, i Boettcher (1865) va descriure la formació de cristalls similars en semen, esput, fetge i melsa. A finals del segle XIX havia deu noms diferents per aquests cristalls, però els més comuns eren cristalls de Charcot-Leyden (Leyden 1872) o cristalls de Boettcher. Aquest últim va nombrar el compost "spermatin" i el considerava una proteïna. En 1878, Schreiner va identificar els cristalls com el fosfat d'una nova base orgànica a la qual va assignar una fórmula errònia,  $C_2H_5N$  (Schreiner 1878). Això va portar a confondre aquest compost amb altres bases orgàniques de fórmula empírica similar, com la etilenamina i la piperazina. Ladenburg i Abel (1888) van ser els primers en utilitzar el nom "spermin". L'estructura de l'espermina va ser finalment establerta en 1926 quan Dudley, Rosenheim i Starling van aconseguir sintetitzar-la al laboratori (Dudley *et al.* 1926). Durant el curs de la síntesi van obtenir una altra base. Després de determinar l'estructura d'aquest nou compost, que van anomenar "spermidine", van comprovar que també existia en els teixits animals (Dudley 1927). La putrescina i la cadaverina, com suggereixen els seus noms, van ser isolades d'entre els productes de la descomposició bacteriana de proteïnes per Brieger (1879) i van ser sintetitzades per Ladenburg (1886). La putrescina és en realitat una diamina de quatre carbonis que en ser el precursor obligat de l'espermidina i l'espermina també es considera una poliamina. L'espermina, la poliamina més complexa, és gairebé específica dels eucariotes superiors mentre que les altres dues són ubíquies.

## 1.1.2 Estructura i propietats

Les poliamines són molècules lineals amb grups amino distribuïts de forma regular al llarg de cadenes de carboni (**Figura 1.1**). El seu pes molecular és de 88 per a la putrescina, 145 per a l'espermidina i 202 UMA per a l'espermina.



**Figura 1.1** Representació 3D de les poliamines. Les esferes negres són àtoms de nitrogen, les grises de carboni i les blanques d'hidrogen.

A pH fisiològic les formes totalment protonades, di-, tri- i tetraamoni, respectivament, són predominants (**Taula 1.1**). En situacions de baixa força iònica però, la proporció de formes desprotonades pot esdevenir significativa.

**Taula 1.1** Constants d'equilibri àcides de les poliamines

	$pK_1$	$pK_2$	$pK_3$	$pK_4$
Putrescina	9,35	10,8	-	-
Espermidina	9,52	10,8	11,56	-
Espermina	8,90	9,79	10,95	11,50

Les primeres desprotonacions tenen lloc als grups amino interiors, mentre que els grups amino primaris terminals, essencials per l'activitat biològica de la molècula, romanen protonats a qualsevol valor de pH biològicament rellevant.

Les PA es diferencien dels cations inorgànics, com el  $Mg^{2+}$  o el  $Ca^{2+}$ , en que presenten un sistema de càrregues (+) a distàncies definides i grups alquilics entre elles capaços d'establir interaccions hidrofòbiques. Això els permet formar interaccions més fortes i més específiques que els cations inorgànics (per revisions sobre el tema veure Davis *et al.* 1992, Marton i Pegg 1995, Thomas i Thomas 2001). Les cadenes de carboni que uneixen els grups amoni són conformacionalment flexibles i permeten als N terminals abastar distàncies crítiques. La presència de dos atoms N al mig de la molècula, fa de l'espermina la PA més flexible amb una distància relativa  $N_1-N_4$  que oscil·la entre 6 i 13,8 Å. En l'espermidina la distància  $N_1-N_3$  pot anar de 9 a 9,8 Å i la molècula és molt més rígida, mentre que la putrescina amb una distància fixa entre  $N_1$  i  $N_2$  de 6,4 Å és completament rígida (Dalla Via 1999). El grau d'hidrofilia de les PA ve determinat per la forma de la capa d'aigua que envolta l'estructura de la molècula i decreix en l'ordre espermina > espermidina > putrescina (Weiger *et al.* 1998). La flexibilitat i el grau d'hidratació de la molècula determinen l'habilitat de les poliamines per unir-se a punts d'unió rígids i/o flexibles en macromolècules o estructures cel·lulars.

### **1.1.3 Funcions fisiològiques**

#### ***1.1.3.1 Interacció amb l'ADN***

La característica individual més important de les poliamines és, segurament, la seva capacitat d'unió als àcids nucleics, en particular a l'ADN. Hi ha una interacció coulòmbica molt forta en fase aquosa entre les PA i l'ADN, de forma que aquests cations són atrets per l'ADN des de distàncies molt llunyanes i, una vegada a prop d'ell romanen allà per llargs períodes de temps (Symons 1995). Les PA neutralitzen les càrregues dels grups fosfat de l'ADN, interaccionen amb les bases de l'àcid nucleic i s'acoblen dintre dels soles major i menor de la doble hèlix (Feuerstein *et al.* 1990, Feuerstein *et al.* 1991, Tippin i Sundaralingam 1997, Deng *et al.* 2000). Aquestes interaccions incrementen la temperatura de fusió de l'ADN de forma dosi-depenent (Thomas i Bloomfield 1984). Els increments són de l'ordre de 10-20°C a concentracions fisiològiques d'espermina la qual cosa suggereix un paper significatiu de les PA en l'estabilització de l'estructura de l'ADN *in vivo*. Una altra efecte de la interacció PA-ADN és la condensació de l'ADN, que es pot observar tant en l'ADN nu (Gosule i Schellman 1976, Pelta *et al.* 1995), com en la cromatina (Marquet *et al.* 1986, Sen i Crothers 1986). Estudis immunocitoquímics han demostrat que l'espermidina i l'espermina s'associen amb cromosomes mitòtics altament compactats (Hougaard *et al.* 1987, Sauve *et al.* 1999), encara que el seu efecte en l'estructura de la cromatina podria ser més estabilitzador que regulador (Laitinen *et al.* 1998). Les poliamines també tenen l'habilitat d'induir canvis conformacionals en l'ADN. La seva unió pot promoure la conversió de la forma dreta (ADN-B) a la sinistra (ADN-Z) (Thomas *et al.* 1991, Bancroft *et al.* 1994, Hasan *et al.* 1995), o a una forma alternativa d'hèlix dreta, l'ADN-A (Jain *et al.* 1989). No obstant, les PA també s'uneixen a l'ADN-B sense que es detecti cap canvi en l'estructura secundària de l'àcid nucleic per espectroscòpia Raman (Deng *et al.* 2000). La

forma ADN-Z ha esta involucrada en el control de la transcripció i és induïda per les PA principalment en blocs de seqüències alternants de purines-pirimidines (Herbert i Rich 1999). Un altre potencial mecanisme de regulació de la transcripció per PA és la torsió que indueixen en la molècula d'ADN quan s'uneixen al seu solc major (Feuerstein *et al.* 1986, Feuerstein *et al.* 1989, Rouzina i Bloomfield 1998). Les poliamines promouen aquesta torsió neutralitzant les cargues negatives dels fosfats de l'ADN i reduint els requeriments d'energia per doblegar la macromolècula. D'aquesta manera, es poden afavorir interaccions ADN-proteïna. La torsió de l'ADN en sí mateixa és un mecanisme important per a la regulació transcripcional de l'expressió gènica (Kerppola 1998, Coulombe 1999). Es considera que permet la interacció de factors de transcripció allunyants en la seqüència d'ADN amb el nucli de la maquinària de transcripció (Ha *et al.* 1997). De fet, moltes proteïnes d'unió a l'ADN exerceixen la seva acció a través de la seva capacitat per doblegar l'ADN i, en organismes superiors, la torsió cooperativa produïda per múltiples factors de transcripció resulta en la resposta requerida en la transcripció. Diversos autors han demostrat que la concentració de PA pot afectar la unió de diversos factors de transcripció a l'ADN (Thomas i Thomas 1993, Panagiotidis *et al.* 1995, Desiderio *et al.* 1999). En el cas del receptor d'estrogen, les PA modifiquen directament la conformació de l'element de resposta a estrogen en l'ADN (Thomas *et al.* 1997a, Lewis *et al.* 2000). Finalment, les PA semblen estar també involucrades en vies de senyalització que regulen la síntesi de factors de transcripció o que modulen la seva activitat d'unió mitjançant fosforilació (Wang *et al.* 1993, Wang *et al.* 1999, Pfeffer *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001b).

### **1.1.3.2 Síntesi d'ADN i proteïnes**

Quan les cèl·lules es priven de PA els primers efectes detectables s'observen en la síntesi d'ADN i proteïnes. La replicació de l'ADN pot quedar aturada un cicle cel·lular després de sembrar les cèl·lules en presència d'inhibidors de la biosíntesi de PA (Fredlund i Oredsson 1996a, Fredlund i Oredsson 1996b) o cultivant les cèl·lules deficientes en enzims biosintètics en absència de PA exògenes (Laitinen *et al.* 1998). Ha estat observat que els nuclis isolats de cèl·lules deplecionades de PA sintetitzen un 70-80% menys d'ADN que els nuclis de cèl·lules control (Kozza i Herbst 1992). Aquestes cèl·lules acumulen petits fragments d'ADN d'un tamany corresponent als fragments d'Okazaki (Pohjanpelto i Hölttä 1996). La cromatina de cèl·lules que han estat sotmeses a una depleció perllongada de PA és més sensible a la digestió per nucleases (Snyder 1989, Basu *et al.* 1992, Laitinen *et al.* 1998).

En la síntesi de proteïnes l'efecte d'una deficiència de PA és detectable per un impediment de la formació dels polisomes (Hölttä i Hovi 1985), que resulta en un descens de la iniciació i/o l'elongació de la síntesi de proteïnes (Takemoto *et al.* 1983). Aquests efectes es poden explicar per l'habilitat de les PA per unir-se i modular les estructures de l'ARNm, l'ARNt i l'ARNr (Kusama-Eguchi *et al.* 1991, Yoshida *et al.* 1999, Igarashi i Kashiwagi 2000). Les molècules d'ARN poden adoptar formes 3D complexes. Són macromolècules molt carregades i els ions metàl·lics i les PA participen en el seu plegament 3D i proporcionen centres actius en molècules d'ARN catalític. Les interaccions entre les PA i l'ARN estan dominades pel nombre i la basicitat dels grups amino de la poliamina.



Aquests grups amino interaccionen amb butxaques electronegatives formades pel camp electrostàtic que s'origina en el plegament de l'ARN. L'efecte de les PA sobre l'ARN no és únicament estructural (promoció i manteniment del plegament 3D o rescat de mutacions desestabilitzadores) sinó també catalític. L'ARN d'alguns virus requereix d'un auto-tall d'ARN després de la replicació per generar molècules funcionals. Tres motius d'ARN catalític han estat descrits: el ribozim HDV, el ribozim “cap de martell” ([angl.] *hammerhead*) i el ribozim “forquilla” ([angl.] *hairpin*). Les PA indueixen el plegament del ribozim “forquilla” en la seva estructura 3D correcta i a més són catalíticament actives (en ordre decreixent amb el nombre de grups amino: espermina > espermidina > NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). (Earnshaw *et al.* 1998) Així mateix, les PA augmenten considerablement l'eficiència de l'auto-tall dependent de Mg<sup>2+</sup> del ribozim VS de la neurospora (Olive *et al.* 1998), i promouen l'auto-tall del viroid *Cocunut cadang cadang* (Liu *et al.* 1998). Per altra banda, les diamines i les oligoamines poden catalitzar la hidròlisi de l'ARN (Kuzuya *et al.* 1997).

### **1.1.3.3 Creixement cel.lular**

La depleció de poliamines comporta canvis en l'expressió de nombrosos gens relacionats amb el creixement. No obstant, els mecanismes moleculars que regulen l'expressió d'aquests gens són desconeguts i les vies regulatòries involucrades es comencen a caracteritzar ara. L'arrest del cicle cel.lular després de la depleció de PA sembla ocórrer a través de la inducció dels inhibidors de cinases dependents de ciclins p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i p27<sup>Kip1</sup> mitjançant un mecanisme dependent de p53 (Kramer *et al.* 1999, Ray *et al.* 1999, Ray *et al.* 2001), encara que existeix una via independent de p53 (Nemoto *et al.* 2001, Ray *et al.* 2001). La depleció de poliamines estabilitza l'ARNm i la proteïna de p53 (Li *et al.* 2001b). En cèl.lules transformades per la sobreexpressió d'enzims biosintètics de PA, l'expressió de p27<sup>Kip1</sup> decreix molt, confirmant el paper d'aquesta proteïna en la interacció entre els nivells de PA i el cicle cel.lular (Ravanko *et al.* 2000). A més dels inhibidors de cinases, l'expressió de varies ciclins es pot veure afectada per la depleció de PA. S'han descrit canvis en l'expressió de les ciclins A, B1 i D1 (Thomas i Thomas 1994, Thomas *et al.* 1997b, Marty *et al.* 2000); essent els canvis en D1 els més aparents. Les alteracions en l'expressió gènica mencionades podrien estar mediades pel factor de transcripció NF-κB que s'activa ràpidament en cèl.lules deplecionades (Pfeffer *et al.* 2001).

### **1.1.3.4 Apoptosi**

La mort cel.lular programada o apoptosi i el creixement cel.lular són dues cares de la mateixa moneda; vies implicades en la seva regulació es solapen parcialment, i un senyal inductor de la proliferació cel.lular en un tipus cel.lular o estat fisiològic pot induir la mort per apoptosi en d'altres cèl.lules o circumstàncies. Així doncs, no resulta sorprenent que les poliamines estiguin involucrades alhora en el creixement de la cèl.lula i en la regulació de l'apoptosi. Paradoxalment, sembla que poden actuar com a agents promotors, moduladors o protectors en l'apoptosi (per una revisió del tema veure Schipper *et al.* 2000). En certes condicions, les PA tenen un efecte citotòxic (Allen *et al.* 1979, Gahl i Pitot 1979).

Concentracions anormalment altes de PA són perjudicials pel creixement de la cèl.lula i poden conduir a la seva mort (He *et al.* 1993, Poulin *et al.* 1993) per apoptosi, segons diferents evidències (Tome *et al.* 1994, Tobias i Kahana 1995, Poulin *et al.* 1995b, Xie *et al.* 1997). L'oxidació de l'espermidina i l'espermina per l'amino oxidasa del sèrum o per la poliamina oxidasa intracel.lular dependent de FAD produeix H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i aminoaldehids que són forts inductors de l'apoptosi (Parchment i Pierce 1989, Ha *et al.* 1997). Per altra banda, les PA semblen capaces d'induir l'apoptosi sense oxidació (Brunton *et al.* 1991, Mitchell *et al.* 1992, Alhonen *et al.* 2000), i no està clar quin dels dos mecanismes és més important en les cèl.lules. Varis estudis en diferents sistemes cel.lulars han reportat que l'activitat de l'ornitina descarboxilasa (ODC), l'enzim clau en la biosíntesi de PA, augmenta de forma sensible i ràpida després de la inducció de l'apoptosi (Donato *et al.* 1991, Grassilli *et al.* 1991, Manchester *et al.* 1993, Desiderio *et al.* 1995, Penning *et al.* 1998, Lindsay i Wallace 1999).

Malgrat que l'acumulació de PA pot disparar l'apoptosi, una reducció en els nivells de PA, especialment d'espermidina i espermina, és un fet més habitual en l'apoptosi (Manchester *et al.* 1993, Tome *et al.* 1997, Penning *et al.* 1998, Moffatt *et al.* 2000, Nitta *et al.* 2001). La possibilitat de que nivells molt baixos de PA promoguin l'apoptosi sembla una idea més intuïtiva. En primer lloc, la depleció de PA pot conduir a l'arrest del cicle cel.lular o l'apoptosi, a través del seu efecte sobre la via reguladora del cicle cel.lular p53/p21/p27 (Kramer *et al.* 1999, Ray *et al.* 1999, Li *et al.* 1999b). En segon lloc, les PA participen en la regulació del transport d'ions i en l'estabilització de components cel.lulars importants com les membranes o la cromatina. La depleció de PA indueix la desestabilització d'aquestes estructures, conduint a una pèrdua d'integritat de la cèl.lula i, finalment, provocant la seva mort (Schipper *et al.* 2000). No obstant, la depleció de PA de forma aïllada, encara que es produeixi després de l'arrest del cicle cel.lular, pot ser insuficient per induir l'apoptosi (Li *et al.* 1999b, Li *et al.* 2001a), però pot sensibilitzar les cèl.lules a l'apoptosi induïda per altres factors. Aquesta susceptibilitat alterada després de la depleció de PA sembla ser específica de l'inductor, indicant que les PA estan involucrades en la regulació d'algunes, però no totes, les vies apoptòtiques (Stefanelli *et al.* 2001, Li *et al.* 2001a). No és sorprenent que l'espermidina i/o l'espermina tinguin un efecte protector contra l'apoptosi en molts tipus de cèl.lules diferents; des de neurones (Harada i Sugimoto 1997), tumors ascítics d'Ehrlich (Moffatt *et al.* 2000) i cèl.lules B de limfoma (Nitta *et al.* 2001), a paràsits com el *Trypanosoma cruzi* (Piacenza *et al.* 2001). L'efecte protector sembla ser específic de la via que indueix l'apoptosi (Hegardt *et al.* 2000) i podria implicar l'activació de la transcripció de gens requerits per la proliferació i la supervivència (Shah *et al.* 2001).

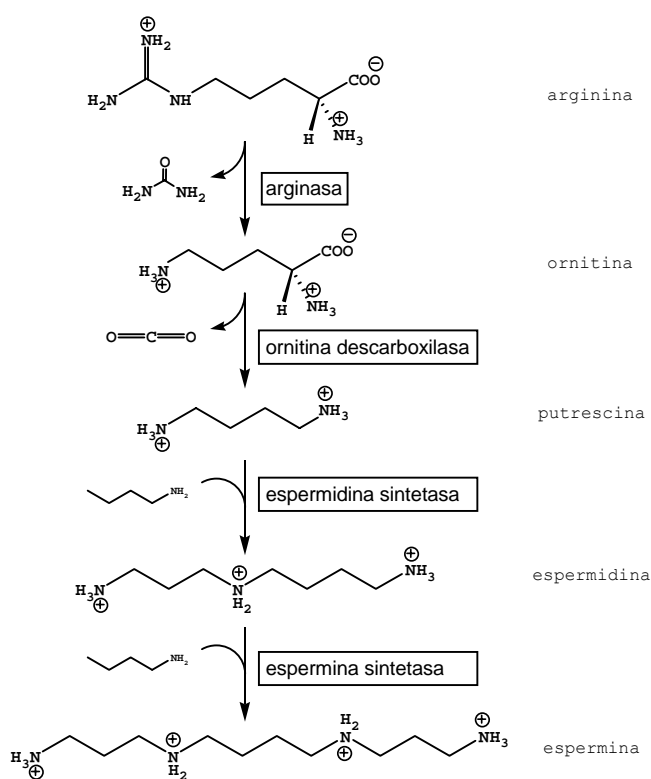
Encara que no coneixem els mecanismes que poden disparar l'apoptosi per excés o deficiència de PA, podem assumir que els nivells anormals interfereixen amb les seves funcions en la fisiologia de la cèl.lula. S'ha suggerit que la importància fisiològica real de la síntesi de PA resideix en el control del cicle cel.lular i en la supervivència de la cèl.lula (Schipper *et al.* 2000). Des d'aquest punt de vista, la inducció sobtada de l'ODC que s'observa sovint durant l'apoptosi podria estar relacionada amb la progressió de la cèl.lula a través del cicle cel.lular fins a arribar a un dels punts de control, des d'on l'apoptosi es dispararia en resposta a senyals inductors de mort cel.lular. Alternativament, en condicions

en les que l'apoptosi està inhibida i/o les cèl·lules tenen lesions genètiques, l'expressió constitutiva de l'ODC podria portar a la transformació de la cèl·lula i al creixement cel·lular desregulat (Auvinen *et al.* 1992, Moshier *et al.* 1993, Auvinen *et al.* 1997). Un cop superat aquest punt de control, els nivells de PA més aviat disminuirien durant el procés d'apoptosi.

## 1.1.4 Metabolisme de les poliamines en mamífers

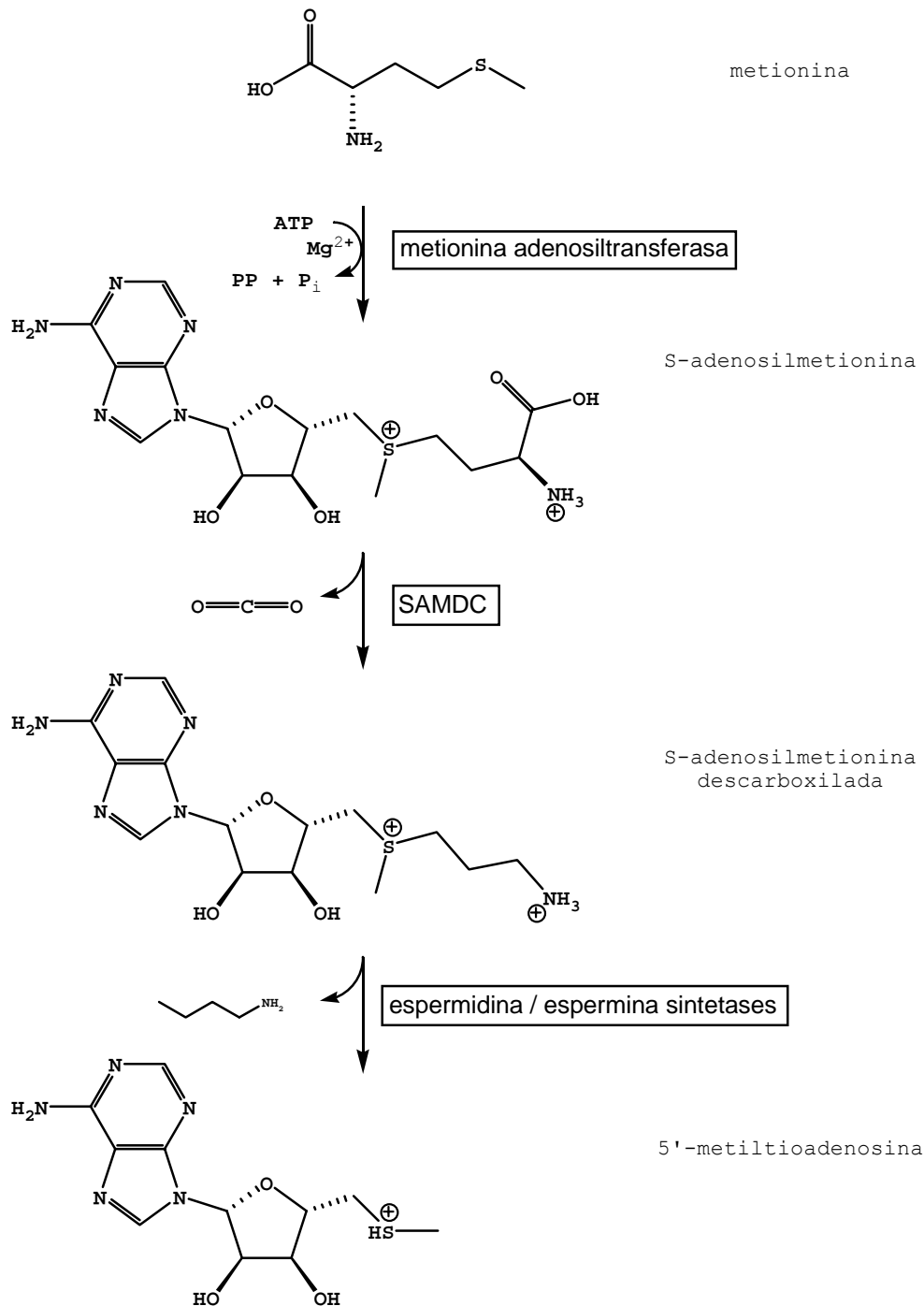
### 1.1.4.1 Biosíntesi

La majoria de les cèl·lules de mamífer té la capacitat de produir les PA que necessiten. L'ornitina és el precursor exclusiu per a la síntesi *de novo* de PA. Tal vegada, l'ornitina només pot ser sintetitzada per l'acció de l'arginasa [EC 3.5.3.1] (Tabor i Tabor 1966). La dieta constitueix l'aportació principal d'arginina a l'organisme. A l'intestí existeix una via alternativa on la pirrolín-5-carboxisintetasa produeix arginina fent servir la glutamina com a substrat (Wakabayashi *et al.* 1995). També s'ha descobert la presència d'activitat arginina descarboxilasa [EC 4.1.1.19] en teixits animals (Li *et al.* 1994a). Aquest enzim catalitza la síntesi d'agmatina, un metabòlit que utilitzen els bacteris i les plantes per produir putrescina. La seva funció en animals és encara desconeguda, però podria oferir una ruta secundària per sintetitzar putrescina en teixits específics. Tot i això, l'arginasa, que catalitza la conversió d'arginina en ornitina (**Figura 1.2**) continua considerant-se imprescindible per subministrar precursors de PA en el mamífer.



**Figura 1.2** Ruta de síntesi de poliamines en mamífers.

L'eliminació del grup carboxil de l'ornitina per obtenir una molècula de putrescina és l'etapa clau de la ruta de síntesi i està catalitzada per l'ornitina descarboxilasa (ODC; [EC 4.1.1.17]). La síntesi de l'espermidina i espermina està lligada al metabolisme de la metionina, en particular a la síntesi de *S*-adenosilmetionina, un donador universal de grups aminopropil en la cèl·lula (**Figura 1.3**). L'enzim *S*-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC; [EC 4.1.1.50]) proporciona els aminopropils que un enzim transferasa (espermidina sintetasa [EC 2.5.1.16] o espermina sintetasa [EC 2.5.1.22]) incorpora en les amines primàries del residu original de putrescina.

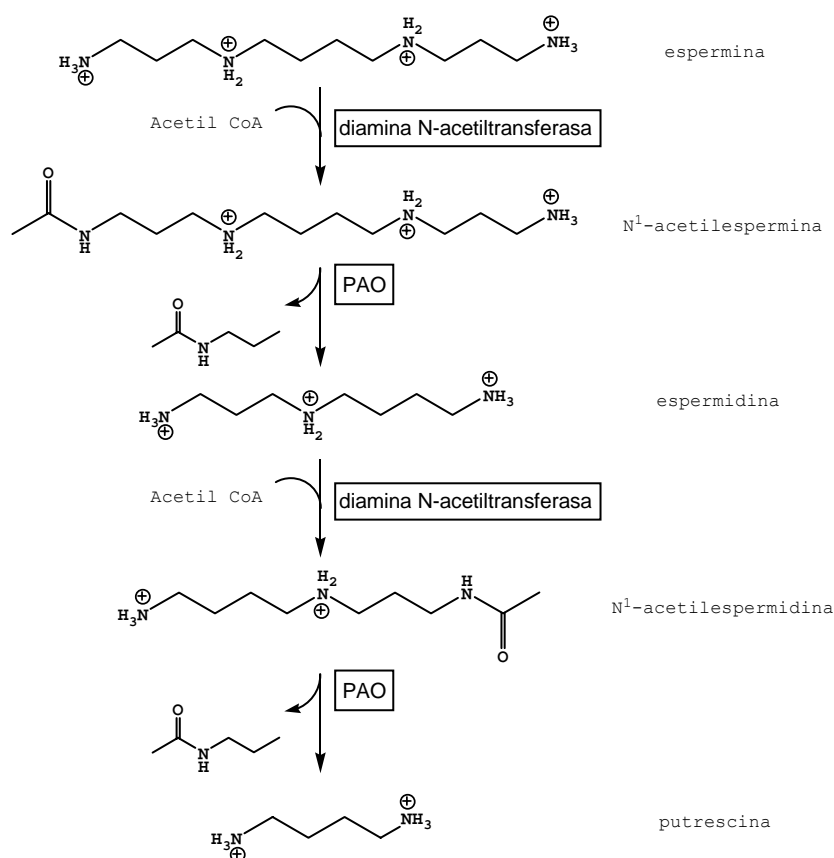


**Figura 1.3** Síntesi del grup aminopropil.

### 1.1.4.2 El cicle d'interconversió de la putrescina

Nombroses proves experimentals indirectes conduïren a la proposta d'un cicle d'interconversió de la putrescina en cèl·lules animals (Pegg i McCann 1982). La primera part d'aquest cicle és la formació d'espermidina i espermina catalitzada pels enzims abans esmentats. La segona part comprèn la retroconversió d'espermina a espermidina i d'espermidina a putrescina (**Figura 1.4**). Dues reaccions aparellades permeten degradar els grups aminopropil i obtenir novament el residu lliure de la putrescina: (1) l'acetilació específica d'una de les amines primàries i (2) el trencament de les  $N^1$ -acetilpoliamines resultants en un aldehid i la poliamina anterior en la ruta de síntesi.

Les PA poden ser acetilades en diferents situacions i per diferents enzims. L'enzim que participa en el cicle d'interconversió és citosòlic i s'anomena diamina  $N$ -acetiltransferasa (originalment spermidine/spermine  $N_1$ -acetiltransferasa) [EC 2.3.1.57]. En el nucli les PA són acetilades per l'histona acetiltransferasa 1 [EC 2.3.1.48] (Libby 1983). Ambdós es distingeixen per la seva especificitat de substrat i la seva resposta a inhibidors (Dalla Ragione i Pegg 1984).



**Figura 1.4** Ruta d'acetilació/oxidació en el cicle d'interconversió de les PA.

L'enzim citosòlic és 3.000 vegades més actiu que el nuclear, té com a donador de grups acetil la molècula d'acetil CoA i només acetila substrats que tenen una estructura de tipus  $R-NH-(CH_2)_3-NH_2$ . Quan aquest substrat és l'espermidina el producte és exclusivament

$N^1$ -acetilespermidina. El segon enzim actua sobre histones, putrescina, espermidina i espermina. En particular, acetila l'espermidina per produir majoritàriament  $N^8$ -acetilespermidina, un compost de funció desconeguda que pot ser reconvertit en espermidina. Una altra reacció d'acetilació no inclosa en el cicle produeix acetilputrescina, un compost que es troba en molt baixes concentracions en la majoria de teixits animals excepte en el cervell, on la síntesi d'àcid  $\gamma$ -aminobutíric (GABA) a partir de la putrescina té una importància singular (Seiler i Al-Therib 1974).

Les  $N^1$ -acetilpoliamines són ràpidament degradades per un enzim oxidant, poliamina oxidasa dependent de FAD (PAO; [EC 1.5.3.3]). L'afinitat de substrat en aquest cas és molt gran, i com l'activitat d'aquest enzim és molt superior a la del diamina *N*-acetiltransferasa, el contingut cel·lular de les formes acetilades és, amb freqüència, molt baix. Per contra, la concentració de PA acetilades és significativament alta en l'orina. D'aquesta forma l'acetilació de les poliamines a través del diamina *N*-acetiltransferasa sembla ser el factor limitant en la degradació i interconversió d'aquestes molècules. Considerat tot com un cicle d'interconversió, l'acció seqüencial d'aquests dos enzims sobre l'espermidina produeix espermidina, i sobre aquesta última tanca el cicle produint putrescina. L'espermidina i la putrescina formades en aquest procés degradatiu poden ser utilitzades per a la síntesi *de novo* de PA, però, a la vegada, poden satisfer altres requeriments fisiològics com la producció de GABA o l'eliminació d'un excés tòxic de PA. En la reacció catalitzada pel PAO, les poliamines acetilades són seccionades en dues molècules: la poliamina corresponent i el 3-acetamidopropanal. Aquest aldehyd conté el residu de metionina que ha entrat al cicle mitjançant SAMDC, i el grup acetil que prové de l'acetilCoA. El seu destí sembla ser la síntesi de  $\beta$ -alanina (Seiler 1990). Els substrats del PAO són les  $N^1$ -acetilpoliamines i  $N^1, N^{12}$ -acetilespermidina. L'espermidina i l'espermina són substrats molt més pobres (Pegg 1986).

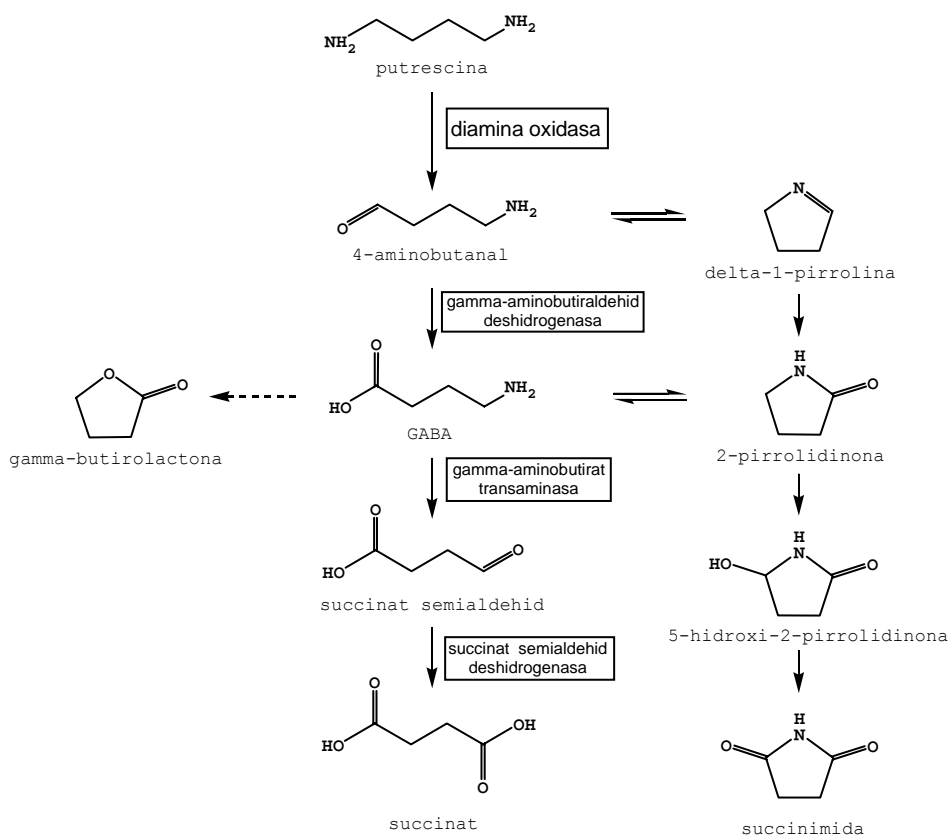
### **1.1.4.3 Catabolisme de poliamines**

El catabolisme és l'aspecte menys conegut del metabolisme de les poliamines. Existeixen un gran nombre d'enzims que oxiden les PA en els mamífers. Alguns d'ells són extracel·lulars, i no es coneix quin paper poden tenir en la degradació de poliamines intracel·lulars. L'orina conté molts productes derivats de les PA excretats per les cèl·lules: les poliamines mateixes, formes acetilades, formes oxidades, metabòlits cíclics, etc.

[EC 1.4.3.6] és una extensa família d'enzims amina oxidases dependents de coure amb diferents afinitats de substrat. Aquests enzims actuen sobre una gran varietat d'amines produint amoníac, peròxid d'hidrogen i aldehids. En el cas de les PA, els aldehids formats no poden ser reconvertits en poliamines i es considera doncs, que els enzims implicats constitueixen la via del catabolisme terminal, per diferenciar-los dels poliamina oxidasa del cicle d'interconversió (Seiler *et al.* 1985). El subgrup dels amina oxidases amb coure és molt heterogeni. Hi ha enzims d'aquest tipus en multitud de teixits animals, en el plasma, en plantes, en bacteris, en fongs i en llevats. Els enzims d'origen animal són molt diferents entre ells, existint formes solubles i formes unides a membrana. La seva especificitat de substrat és molt àmplia, a diferència dels enzims bacterians on és molt rigorosa. Els enzims

d'origen animal metabòlitzem poliamines, diamines i monoamines incloent-hi amines sense paper fisiològic conegut. Això pot representar un mecanisme de destoxicació d'amines biògenes en teixit i en sang. Els dos casos més estudiats són els diamina oxidases (Fogel *et al.* 1981, Rokkas *et al.* 1990a, Rokkas *et al.* 1990b, Erdman *et al.* 1990) i l'amina oxidasa del sèrum (Gahl *et al.* 1980, Gahl i Pitot 1982).

Tant les poliamines lliures com les acetilades són substrats, amb més o menys afinitat, d'alguna amina oxidasa dependent de coure. Els aldehids que es generen en una primera etapa són oxidats per produir l'aminoàcid corresponent (Seiler 1990). Entre els diamina oxidases hi ha un enzim anomenat diamina oxidasa (DAO) (també putrescina oxidasa i histaminasa) amb un paper central en el catabolisme terminal de les PA: per una part, modula la presència de putrescina, i per una altra coordinat amb la ruta d'acetilació i oxidació PAO/SSAT catabolitzava qualsevol de les altres dues PA (Pegg i Erwin 1985). De la desigual distribució d'aquesta família d'enzims en l'organisme es dedueix que les reaccions catabòliques terminals no participen en la regulació dels nivells cel·lulars de poliamines d'un mode general. Més aviat, aquestes reaccions semblen tenir funcions reguladores en teixits especialitzats com la mucosa intestinal (Bieganski *et al.* 1983, Kusche *et al.* 1985) o en determinats estats fisiològics com l'embaràs (Piacentini *et al.* 1986). En aquest sentit, un increment en l'activitat DAO placentària contraresta les disminucions de la pO<sub>2</sub> en la circulació fetoplacentària (Bardsley *et al.* 1974, Maguire *et al.* 1992).



**Figura 1.5** Esquema parcial dels metabòlits originats a partir de la desaminació de la putrescina en teixits animals.

### 1.1.5 Les poliamines en la sang

Les PA estan presents en tots els compartiments de la sang, però circulen majoritàriament dintre de compartiments cel·lulars. Malgrat que els leucòcits presenten els nivells més alts, el fet de que la sang contingui 600 eritròcits per cada leucòcit implica que les concentracions intraeritrocitàries determinen el contingut de PA de la sang (Cohen *et al.* 1976).

Al sèrum, les PA es poden trobar interaccionant amb diferents components, molts dels quals encara no estan caracteritzats. Catros-Quemener *et al.* (1997) van demostrar que les lipoproteïnes d'alta densitat transporten una part important de les PA plasmàtiques, les lipoproteïnes de baixa densitat una part minoritària, i un 40-60 % restant està associat a proteïnes. La unió a lipoproteïnes està basada, majoritàriament, en interaccions electrostàtiques entre càrregues (+) de les PA i càrregues (-) dels fosfolípids (aquests últims constitueixen fins un 40% del pes de les lipoproteïnes d'alta densitat). Les interaccions PA-fosfolípids i els seus efectes sobre les propietats físiques i biològiques dels segons han estat caracteritzades àmpliament (per una revisió veure Schuber 1989). Quash i Wilson (1967) van reportar l'existència de complexos lipoespermina en el sèrum de pacients oncològics. Les PA també es poden unir de forma covalent a diferents proteïnes plasmàtiques (Delcros *et al.* 1987). Es poden incorporar en l'apolipoproteïna B, la fibrinectina i d'altres proteïnes a través dels transglutaminases [EC 2.3.2.13] plasmàtics i cel·lulars (Cocuzzi *et al.* 1990, Roch *et al.* 1980, Galli *et al.* 2001). Poden modificar l'activitat d'enzims plasmàtics (Sugahara *et al.* 1989). Finalment, el sèrum humà i el d'altres mamífers conté anticossos IgG i IgM que reaccionen de forma específica contra les poliamines (Roch *et al.* 1979, Ripoll *et al.* 1980, Roch *et al.* 1990).

En els eritròcits, les PA es troben en forma lliure al citoplasma, unides a l'estroma mitjançant enllaços electrostàtics i covalents amb proteïnes (Natta i Kremzner 1982), i interaccionant amb lípids i proteïnes de membrana (Bratton 1994, Sulpice *et al.* 1996, Kohno *et al.* 1997). Durant la diferenciació terminal dels precursors eritroides, l'espermidina i l'espermina són indispensables per a la síntesi massiva d'hemoglobina (Watanabe *et al.* 1985, Delcros *et al.* 1995). Altres etapes de la eritropoiesi, com la condensació de la cromatina (Hougaard *et al.* 1988) o l'increment en la incorporació de ferro (Loh *et al.* 1985) també poden dependre de les seves concentracions intracel·lulars de PA. Per altra banda, existeixen evidències de que altes concentracions de PA en el sèrum de pacients urèmics amb anèmia inhibeixen l'eritropoiesi (Radtke *et al.* 1984, Kushner *et al.* 1991). Un cop l'eritrocit madur s'allibera del nucli, aparell de Golgi, centriols, retícul endoplasmàtic i mitocondries queda amb una dotació de PA que, en endavant, es modularà mitjançant la incorporació, la degradació i l'exportació. Els sistemes d'incorporació i exportació de PA a l'eritrocit estan parcialment caracteritzats (Moulinoux *et al.* 1984, Fukumoto i Byus 1996) i la presència de PA radiomarcades ingerides en els eritròcits ha estat demostrada (Dorhout *et al.* 1997). Puix que els eritròcits no tenen activitat biosintètica, es considera que les funcions de les PA en aquestes cèl·lules estan relacionades amb el manteniment de la



integritat cel·lular i del seu reduït metabolisme. Els aspectes més estudiats són aquells relacionats amb el manteniment de la membrana i el citoesquelet.

Les PA s'acumulen en els eritròcits per sobre dels nivells "normals" en moltes situacions fisiològiques i patològiques, encara que en mancar un model general per l'homeòstasi de les PA en l'organisme aquests resultats són difícils d'interpretar. Especial atenció han rebut els augments observats en processos cancerosos, ja que es considera que existeix una relació directa entre l'alt grau de proliferació cel·lular en els tumors i els nivells de PA en els eritròcits (Cipolla *et al.* 1996, Leveque *et al.* 1999, Linsalata *et al.* 2000). També s'estudia el valor pronòstic dels nivells de PA després de la intervenció en diferents patologies (p. ex., Bergeron *et al.* 1989, Tsukamoto 1997, Porciani *et al.* 2001).

### **1.1.6 Les poliamines en l'intestí**

El paper essencial de les poliamines en el desenvolupament i la maduració del budell està ben documentat. Experiments en diferents espècies de mamífers demostren que les PA alimentàries indueixen moltes de les modificacions bioquímiques i morfològiques involucrades en la maduració intestinal postnatal dels lactants (Kelly *et al.* 1991, ter Steege *et al.* 1997, Peulen *et al.* 1998). Durant el funcionament normal de l'intestí, els components de la dieta i els factors de creixement i hormones segregats pel tracte gastrointestinal modulen les activitats del metabolisme de les PA en la mucosa intestinal (White i Bardocz 1999, Koyama *et al.* 1995, Wollin *et al.* 1998). Al seu torn, les PA estan involucrades en processos fisiològics com la migració cel·lular (Rao *et al.* 1999), el manteniment i la reparació de la mucosa (Li *et al.* 2001), la contractilitat muscular (Sward *et al.* 1997) o la resposta immune/inflamatòria (ter Steege *et al.* 1999).

El metabolisme de les PA en el tracte gastrointestinal sembla estar íntimament lligat a la proliferació cel·lular de la mucosa (McCormack i Johnson 1991). Les cèl·lules en divisió a les criptes estan exposades a quatre fonts de PA: (a) les cèl·lules progenitores contenen ODC i sintetitzen PA sota el control d'hormones tròfiques com la gastrina i factors de creixement com el FCE; (b) la llum intestinal conté PA provinents dels aliments i secrecions, i sintetitzades per bacteris són absorbides per mecanismes de transport específics presents als enteròcits; (c) l'aport luminal s'incrementa amb les PA presents a cèl·lules madures exfoliades; (d) un efecte paracrí on la circulació local transporta les PA absorbides i sintetitzades per les cèl·lules dels villi a les cèl·lules *stem*. Per altra part, l'exfoliació de cèl·lules, promoguda per estímuls físics, i l'augment de l'ODC en els enteròcits dels villi, induït pels nutrients, formen un mecanisme de retroacció que iguala la velocitat de proliferació cel·lular amb la velocitat de perdua de cèl·lules en la mucosa. La integritat de la mucosa depèn directament d'aquest balanç entre renovació i mort cel·lular. Un dels aspectes específics del metabolisme de les PA en l'intestí és l'alta activitat DAO del teixit. L'activitat creix progressivament des de l'estómac a l'ili per disminuir de nou al còlon. L'enzim es sintetitza de forma massiva als enteròcits i un 66% es transloca a la lamina pròpia, on queda unit a les cèl·lules endotelials dels capil·lars (Dowling 1990). Puix que el

DAO té una afinitat molt alta per la putrescina, una activitat DAO baixa a la mucosa intestinal condueix a l'acumulació de putrescina i l'estimulació del creixement en el teixit. La disminució de l'activitat DAO es pot observar en models experimentals d'hiperplàsia activitat però no es sap si és un fenomen primari o secundari, ni quin és el mecanisme de reducció de l'activitat (Rokkas *et al.* 1990b , Erdman *et al.* 1989).

S'ha fet un gran esforç en la investigació del paper de les PA en els processos patològics intestinals. Especialment interessant resulta la caracterització dels canvis que ocorren en el metabolisme de les PA durant l'adaptació intestinal (Luk i Yang 1988, Erdman *et al.* 1989, Chung *et al.* 1993, Czernichow *et al.* 1997, Welters *et al.* 1999). Puix que ja es disposa d'evidències sòlides i coneixement detallat sobre el seu paper en la fisiologia de l'òrgan (especialment en el manteniment de la integritat de la mucosa), la possibilitat de poder modular el procés d'adaptació intestinal a través del metabolisme de les PA esdevé molt atractiva.

Finalment, continua molt actiu l'estudi de les PA en els càncers gastrointestinals, particularment en els tumors colorectals. Degut a la seva íntima associació amb la proliferació cel.lular en els teixits, s'investiga la utilitat de diferents variables relacionades amb les PA com a marcadors biològics de risc, recidiva o resposta a tractament paliatiu (Wang *et al.* 1996, Giardiello *et al.* 1997, Shigesawa *et al.* 1998). Continuen apareixent estudis *in vitro* i en models experimentals de càncer de còlon on s'aporten noves dades sobre la relació entre PA i el creixement tumoral (Turchanowa *et al.* 2001, Ray *et al.* 2001, Erdman *et al.* 1999). En el camp de la quimioteràpia, els estudis clínics amb difluorometilornitina (DFMO) es centren en el seu valor com agent quimiopreventiu (Meyskens *et al.* 1998, Carbone *et al.* 1998) mentre que l'últim estudi clínic amb N<sub>1</sub>,N<sub>11</sub>-dietilnorespermina es va suspèndre per una elevada toxicitat en el sistema nerviós central (Creaven *et al.* 1997).

### **1.1.7 Les poliamines i el càncer**

Les concentracions i la biosíntesi de poliamines mostren increments importants en cèl.lules i teixits cancerosos (Pegg 1988, Marton i Pegg 1995). Els increments no són sempre consistents o significatius (Braverman *et al.* 1990, Sandler *et al.* 1992), però un gran nombre d'estudis reporten valors superiors d'ambdós paràmetres respecte els teixits normals. En absència d'un sistema cel.lular de transport de PA caracteritzat no és possible conèixer quin percentatge de les PA acumulades en els tumors prové de la incorporació i quin del metabolisme cel.lular. Els augments de PA en els tumors no sempre es correlacionen amb increments d'activitat ODC. Per altra banda, els inhibidors de la síntesi de PA, inclosa la DFMO (un inhibidor molt potent de l'ODC, altament específic i sense efectes secundaris importants), han donat resultats molt limitats en la quimioteràpia de diferents tumors (Abeloff *et al.* 1986, Talpaz *et al.* 1986, Harari *et al.* 1990, Prados *et al.* 2001, Herr *et al.* 1986, Paridaens *et al.* 2000). No obstant, existeixen diferents línies d'evidències sobre la participació de l'ODC en el desenvolupament del càncer. L'ODC s'activa després del tractament amb carcinògens químics i promotors tumorals, així com en

cèl.lules transformades per oncogens com *v-src*, *neu* i *ras* (Höltkä *et al.* 1988, Pegg 1988, Sistonen *et al.* 1989a, Sistonen *et al.* 1989b, Auvinen *et al.* 1992). A més, la sobreexpressió d'ODC humana en fibroblasts induïx la transformació maligna de forma autònoma (Auvinen *et al.* 1992, Moshier *et al.* 1993, Auvinen *et al.* 1997) o condicionada a la coexpressió *c-Ha-ras* (Hibshoosh *et al.* 1991) segons evidències contradictòries. Aparentment, els fibroblasts que sobreexpressen ODC són més susceptibles a la transformació per *c-Ha-ras* que la línia parental.

La primera vegada que es va suggerir una participació de l'ODC en la carcinogènesi va ser en uns estudis realitzats en un model de càncer de pell (O'Brien *et al.* 1975a, O'Brien *et al.* 1975b). Els papilomes iniciats per un promotor carcinogènic i promoguts per un èster de forbol presentaven fortes induccions de l'activitat ODC. Les cèl.lules que sobreexpressen ODC poden originar tumors en ratolins atímics (Auvinen *et al.* 1992), però els ratolins transgènics que sobreexpressen ODC no mostren major susceptibilitat a la formació espontània de tumors (Alhonen *et al.* 1995) i, fins i tot, són capaços de mantenir nivells normals de PA en els seus teixits (Halmekytö *et al.* 1991a, Halmekytö *et al.* 1993). Sí que mostren, en canvi, un augment en la formació de papilomes en resposta a la promoció química de tumors de pell (Halmekytö *et al.* 1992). El ratolí transgènic K6/ODC, sobreexpressant ODC en queratinòcits del folicle pilòs, va mostrar uns resultats similars, en aquests cas amb una major susceptibilitat a la tumorigènesi espontània (Megosh *et al.* 1995, O'Brien *et al.* 1997). Es va observar que els tumors eren portadors d'una mutació en *Ha-ras* després d'una dosi d'iniciació de carcinògen, i que quan K6/ODC es creuaven amb transgènics TG.AC *v-Ha-ras*, el doble transgènic produïa carcinomes de pell espontanis (Smith *et al.* 1998). De la mateixa manera, només les cèl.lules cotransfectades amb ODC i *Ha-ras* formen tumors en ratolins atímics (Clifford *et al.* 1995). Per altra banda, K6/ODC (ara anomenats K5/ODC) han demostrat ser molt més sensibles a la radiació UVB que el model animal de sensibilitat a la fotocarcinogènesi que es venia utilitzant fins ara (Bickers i Athar 2001). El descens en la susceptibilitat a la carcinogènesi que provoca la sobreexpressió d'un inhibidor natural de l'ODC, l'antienzim, aporta una evidència indirecta del paper central de l'ODC en la carcinogènesi epidèrmica (Feith *et al.* 2001).

No està clar per què l'expressió forçada de l'ODC condueix a la transformació maligna. S'ha reportat com algunes vies de transducció de senyals s'activen en resposta a la sobreexpressió d'ODC (fosforilació de Sos-1, Raf-1 i c-Jun), mentre que d'altres (Erk-1 i Erk-2) semblen no participar-hi (Paasinen-Sohns i Höltkä 1997). A nivell del cicle cel.lular, les activitats de la ciclina D1, la cinasa depenent de ciclina D1 (CDCD1) i la CDC4 s'elevan en els transformants mentre que l'expressió de p27<sup>Kip1</sup> cau de forma constitutiva i la seva proteïna desapareix dels complexos ciclina E/CDC2 (Ravanko *et al.* 2000).

Cal recollir, per últim, la possibilitat de que existeixin formes d'ODC específiques o amb una regulació alterada en cèl.lules tumorals ja que l'activitat ODC en alguns tumors esdevé sensible a la GTP (O'Brien *et al.* 1986, O'Brien *et al.* 1987, Hietala *et al.* 1988).

## 1.2 L'ornitina descarboxilasa

La formació *de novo* de putrescina en els mamífers depèn de la presència d'ornitina descarboxilasa en les cèl·lules. L'enzim actiu és un homodímer amb simetria doble. Cadascun dels monòmers conté 461 AA, pesa 51 kDa i presenta dos dominis estructurals: els residus 46 al 283 formen un barril  $\alpha/\beta$ , mentre l'extrem carboxi terminal forma un full  $\beta$  (Tobias i Kahana 1993, Osterman *et al.* 1995a, Osterman *et al.* 1995b, Kern *et al.* 1999, Almrud *et al.* 2000). El cofactor universal de l'ODC és el fosfat de piridoxal i les  $K_m$  pel substrat i el cofactor són  $\sim 90 \mu\text{M}$  (Coleman *et al.* 1993, Osterman *et al.* 1994) i 200-300  $\mu\text{M}$  (Obenrader i Prouty 1977, Seely *et al.* 1982b), respectivament.

Tots els gens dels ODC de mamífer tenen 12 exons i 11 introns, amb els mateixos límits exó/intró i una seqüència codificant relativament curta (6-8 kb). El primer intró es considerablement més llarg que la resta i conté elements de regulació demostrats i potencials. La longitud dels exons varia entre 85 pb i 900 pb. Els mamífers tenen diverses seqüències ODC al genoma però aparentment només una d'elles és un gen funcional mentre que la resta són pseudogens. El gen de l'ODC humà actiu es troba en el cromosoma 2 (Winqvist *et al.* 1986, Hsieh *et al.* 1990, Radford *et al.* 1990) i el de ratolí en el cromosoma 12 (Cox *et al.* 1988).

L'ARN missatger de l'ODC s'expressa de forma característica en diferents espècies de mamífers. Els rosegadors presenten dos trànscripats, un més llarg de 2,6-2,7 kb i un altre de 2,1-2,2 kb, que resulten de la utilització de dos senyals de poliadenilació diferents presents a la regió 3' no traduïda (Berger *et al.* 1984, Kontula *et al.* 1984, Gilmour *et al.* 1985, van Kranen *et al.* 1987). Els humans, en canvi, malgrat tenir els mateixos senyals de poliadenilació només expressen el trànscripats més curt (Hickok *et al.* 1987, Radford *et al.* 1990). La pauta oberta de lectura que codifica els ODC de mamífer conté 1383 nt molt conservats. La regió 5' no traduïda és excepcionalment llarga ( $>300$  nt), amb una seqüència líder molt rica en GC que pot formar estructures 2D (Brabant *et al.* 1988, Katz i Kahana 1988, Wen *et al.* 1989). La regió conté una petita pauta oberta de lectura que pot participar en la regulació de la traducció, encara que els nucleòtids que flanquegen el lloc d'inici de la traducció no es corresponen exactament a la seqüència consens d'inici de la traducció (Kozak 1989).

L'ODC és un enzim sotmès a una regulació molt forta. L'activitat de l'enzim pot ser induïda ràpidament, fins a centenars de vegades, per una gran varietat de factors estimuladors dels creixement i la proliferació cel·lular. Aquests inclouen des d'hormones i factors de creixement a aminoàcids naturals com l'asparagina i anàlegs no metabòlitzables dels aminoàcids com l'àcid  $\alpha$ -aminobutíric. En quasi tots els casos, l'increment de l'activitat ve acompanyat per una acumulació equivalent de proteïna ODC, la qual cosa suggereix que l'ODC no està regulada per modificacions posttraduccionals o factors al·lostèrics. L'acumulació de proteïna es controla a través de la transcripció del gen, la traducció de l'ARNm i la degradació de l'enzim. I a més, l'activitat ODC s'inhibeix específicament per la proteïna antienzim (AZ) i es regula per retroacció per les PA (revisat a Davis *et al.* 1992,

Shantz i Pegg 1999). Un increment en la quantitat d'ARNm-ODC es detecta quasi sempre que s'estimula l'activitat ODC. Això sembla respondre bàsicament a un augment en la transcripció, però l'estabilització del trànscrip també ha estat reportada per varis autors (Laitinen *et al.* 1984, Berger i Porter 1986, Hölttä *et al.* 1988, Chen i Chen 1992). La inducció de l'activitat ODC per factors de creixement és un cas paradigmàtic d'inducció per increment dels nivells d'ARNm (Feinstein *et al.* 1985, Greenberg *et al.* 1985). Així mateix, alguns esters de forbol actuen a través de forts increments en els nivells d'ARNm acompanyats, o seguits immediatament, per l'increment de l'activitat enzimàtica (Verma *et al.* 1986a, Verma *et al.* 1986b).

Les vies de senyalització que intervenen en la inducció de l'ODC es coneixen de forma molt parcial. Es sap que la proteïna cinasa C i la fosfolipasa C participen en la estimulació per ester de forbol (Verma *et al.* 1986b). L'activitat proteïna cinasa C també es requereix per la inducció produïda per estrès oxidatiu (Otieno i Kensler 2000). Abrahamsen *et al.* (1992) van reportar que l'activació de la proteïna cinasa A provocava un ràpid augment de la transcripció de l'ODC en cèl.lules de carcinoma adrenal. Finalment, la via MAPK p44/42 sembla ser essencial per què el sèrum, la histamina i l'ATP induïxin l'ODC en cèl.lules endotelials (Flamigni *et al.* 2001).

Els senyals inductors de la transcripció incideixen, en últim terme, sobre el promotor i d'altres elements sensibles de l'ODC. La regió promotora és típica de gens d'expressió ubíqua, amb caixes TATA i CAAT, i àrees riques en GC que són llocs d'unió potencial a factors de transcripció de la família Sp/Krüppel (Black *et al.* 2001). Quatre d'aquests factors: Sp1 (Li *et al.* 1994b, al-Asadi *et al.* 1995, Kumar *et al.* 1995), Sp3 (Kumar i Butler 1997), ZBP-89 (Law *et al.* 1998) i ZBP-99 (Law *et al.* 1999) s'uneixen al promotor i regulen *de facto* l'expressió de gens reportadors o del gen ODC endogen. D'altres factors de transcripció com els dímers c-Myc/Max (Bello-Fernandez *et al.* 1993) i el supressor tumoral WT1 (Moshier *et al.* 1996) també poden regular l'expressió del gen. Un element de resposta a AMPc intervé en la regulació del promotor i pot unir-se a proteïnes nuclears (Palvimo *et al.* 1991, Abrahamsen *et al.* 1992, Palvimo *et al.* 1996). Un element de regulació negativa (lloc putatiu d'unió a proteïnes Ets) ha estat localitzat recentment a la regió del promotor (Zhao *et al.* 2000). Els membres de la família Ets han estat caracteritzats com a mediadors de senyals extracel.lulars, incloent mitògens i esters de forbol (Wasylyk *et al.* 1998). Finalment, malgrat que el promotor ODC no conté un element consens de resposta a androgens, el receptor d'androgens ha estat observat unit a aquesta regió (Bai *et al.* 1998).

Hi ha molts casos on els increments d'activitat i proteïna ODC cel.lular no es poden explicar per increments en la transcripció, per estabilització del trànscrip o estabilització de la proteïna, indicant que la regulació té lloc a nivell de traducció. Els aminoàcids (Kanamoto *et al.* 1987, Chen i Chen 1991, Chabanon *et al.* 2000), la insulina (Blackshear *et al.* 1987, Manzella *et al.* 1991) i el xoc hipotònic (Poulin i Pegg 1990, Lövkvist-Wallström *et al.* 1995, Lövkvist-Wallström *et al.* 2001) semblen induir l'activitat ODC d'aquesta manera. En sentit contrari, les PA poden inhibir-la actuant igualment sobre la traducció (Kameji i Pegg 1987b, Persson *et al.* 1988, Kanamoto *et al.* 1991, Lövkvist *et al.* 1993). L'ARNm ODC té una regió 5' no traduïda composta per: (a) un segment proximal de 180 nt, ric en GC amb una estructura 2D de forquilla i una petita pauta de lectura, i (b) un segment distal

no estructurat. El primer segment i la longitud de tota la regió 5' no traduïda són trets característics dels gens involucrats en la proliferació cel·lular i dels oncogens (Kozak 1989, Gray i Henze 1994). Experiments en lisat de reticulòcit de conill i en cèl·lules en cultiu demostren que la presència del segment ric en GC en l'ODC nativa o en un gen reportador és bàsica per suprimir la síntesi de proteïna (Manzella i Blackshear 1990). La petita pauta de lectura, conté 10 AA invariables en quasi tots els ODC de mamífer. Encara que no està demostrada la seva traducció, la mutació del codó d'iniciació incrementa la traducció de la pauta de lectura principal de gens reportadors (Grens i Scheffler 1990, Manzella i Blackshear 1990, Shantz *et al.* 1996). La regió 3' no traduïda de l'ARNm-ODC també és molt llarga (300 nt) amb menys capacitat per formar estructures 2D. No obstant pot interaccionar amb l'extrem 5' per alliberar l'efecte repressor de la traducció (Grens i Scheffler 1990, Lorenzini i Scheffler 1997). Alguns estimuladors del'ODC com el xoc hipotònic depenen d'aquesta regió no traduïda, i no de la 5', per augmentar la traducció (Lövkvist-Wallström *et al.* 2001). El factor d'iniciació eucariòtic 4F (eIF4F) és un complex que intervé en la traducció dependent de cap desfent les estructures 2D de l'extrem 5' no traduït dels ARNm i facilitant la interacció amb els ribosomes (Gingras *et al.* 1999, Pestova *et al.* 2001). La sobreexpressió d'una de les seves subunitats, eIF4E, provoca la transformació cel·lular i un augment d'un 30% en l'activitat basal ODC, reversible amb DFMO (Shantz i Pegg 1994, Shantz *et al.* 1996b). Pyronnet *et al.* (2000) van descobrir que l'ARNm-ODC també es pot traduir mitjançant un mecanisme independent de *cap* on el ribosoma s'uneix a un lloc d'entrada intern de l'ARNm situat a la regió 5' no traduïda. Aquest mecanisme sembla funcionar durant la transició G2/M del cicle cel·lular, potser aportant les PA requerides abans de la mitosi (Kilpelainen 2001).

La síntesi de proteïnes necessita unes concentracions mínimes de PA, però un excés inhibeix la traducció de molts ARNm. La traducció d'ARNm-ODC, en particular, s'estimula i inhibeix en un rang més baix de concentracions de PA que la traducció general (Ito *et al.* 1990). La inhibició de la traducció per PA ha estat clarament observada en lisat de reticulòcit de conill i en cèl·lules en cultiu (Kameji i Pegg 1987b, Persson *et al.* 1988, Kanamoto *et al.* 1991) i l'efecte depèn de la presència de la regió 5' no traduïda (Ito *et al.* 1990), però en un estudi *in vitro* (van Steeg *et al.* 1991) i en un *in vivo* amb un gen reportador davant de la mencionada regió (Grens i Scheffler 1990) no es va trobar cap efecte de les PA sobre la traducció d'ODC. Puix que també s'ha trobat una regulació independent de la regió 5' no traduïda (van Daalen *et al.* 1989b) sembla probable que la interacció PA/ARNm-ODC sigui específica de les cèl·lules estudiades i que d'altres factors intracel·lulars interaccionin amb els nivells de PA en la traducció.

Encara que es descarta un paper significatiu de les modificacions posttranscripcionals en la regulació de l'ODC, aquestes poden ser importants en teixits específics o en condicions fisiològiques determinades. La fosforilació de l'ODC és l'única demostrada fins el moment (Rosenberg-Hasson *et al.* 1991, Worth *et al.* 1994). En la línia de macròfags transformats RAW264, l'ODC va mostrar fosforilació al menys en dues serines i dues treonines (Worth *et al.* 1994, Reddy *et al.* 1996). L'ODC fosforilat sembla ser més estable que la forma no fosforilada i la seva  $V_{max}$  és un 50% superior (Reddy *et al.* 1996). Altres modificacions menys estudiades comprenen: l'associació amb proteïnes cel·lulars insolubles en

queratinòcits (Pomidor *et al.* 1999) o la translocació a la superfície de la membrana cel·lular durant l'activació i la transformació cel·lular (Heiskala *et al.* 1999).

L'ODC és una proteïna molt làbil. La vida mitjana de la seva activitat és de les més curtes entre els enzims de mamífers, variant entre 10 min i 2 h (Seely *et al.* 1982a, Isomaa *et al.* 1983, Hayashi *et al.* 1996), i és conseqüència d'una ràpida degradació de la proteïna ja que la vida mitjana de l'ODC immunoreactiva és una mica superior a l'activitat enzimàtica (Isomaa *et al.* 1983, Laitinen *et al.* 1984). Un temps de renovació curt és essencial per una regulació sensible i una inducció ràpida de l'activitat. Quan la síntesi de proteïnes s'incrementa, la quantitat de proteïnes làbils augmenta molt més ràpidament que la de les proteïnes estables (Tabor i Tabor 1984). La ruta de degradació de l'ODC és absolutament excepcional. Una proteïna inhibidora, l'antienzim (AZ), s'uneix al monòmer ODC, inhibeix la seva activitat i l'assenyala per degradació pel proteosoma 26S (Murakami *et al.* 1992a). La inhibició o la immunoprecipitació del proteosoma inhibeix quasi completament la degradació de l'ODC, la qual cosa indica que aquesta és la via principal de degradació de l'enzim (Murakami *et al.* 1999). La degradació de l'ODC està regulada de forma tan estricta com la síntesi, i proporciona un altre mitjà per controlar els nivells de PA a les cèl·lules. Existeixen diverses observacions d'un increment en l'estabilitat de l'ODC durant la inducció de l'activitat enzimàtica. Els androgens provoquen una forta elevació de l'activitat ODC en el ronyons, conseqüència, en part, d'un increment de 4-10 vegades en la vida mitjana de l'ODC (Seely *et al.* 1982a, Isomaa *et al.* 1983). El xoc hipotònic, per altra banda, resulta en un increment de 3-6 vegades en la vida mitjana (Poulin i Pegg 1990, Tohyama *et al.* 1991). Es considera que el factor més important en la estimulació de la degradació de l'ODC són les PA (Glass i Gerner 1986, Hölttä i Pohjanpelto 1986, Kanamoto *et al.* 1986) a través de la seva inducció de la transcripció de l'antienzim (Heller *et al.* 1976, Fong *et al.* 1976).

### **1.3 L'antienzim**

L'antienzim va ser descrit inicialment com una proteïna que era capaç d'inhibir l'activitat ODC i que s'indueïa afegint poliamines a cèl·lules en cultiu (Fong *et al.* 1976, Heller *et al.* 1976). Posteriorment s'ha comprovat que l'AZ assenyala l'ODC per degradació (Murakami *et al.* 1992a), regula el transport de PA a l'interior de la cèl·lula (He *et al.* 1994, Mitchell *et al.* 1994) i, potencialment, la seva excreció al medi (Sakata *et al.* 2000). L'antienzim pertany a una família molt antiga de gens. Quatre dels seus membres han estat identificats en els humans, codificats per diferents gens. Presenten trets comuns i una forta homologia estructural, especialment en la meitat carboxi terminal, necessària per a la unió amb l'ODC (Coffino 2001a). Tots els antienzims són capaços d'associar-se a l'ODC i reduir la seva activitat. Algunes isoformes també potencien la seva degradació. La més estudiada, abundant i ubiqua és l'antienzim 1 (abreviat aquí com AZ). L'AZ té un pes molecular de 26 kDa i està compost per una cadena polipeptídica de 227 AA en el ratolí (Kankare *et al.* 1997) i 228 AA en humans (Tewari *et al.* 1994). L'alta afinitat pel monòmer d'ODC ve

demostrada pel valor de la seva constant de dissociació:  $K_d \sim 10^{-11} \text{ M}^{-1}$  (Kitani i Fujisawa 1984).

L'AZ juga un paper important en la regulació dels nivells cel·lulars de PA i els canvis en la seva expressió poden afectar funcions cel·lulars i ser fisiològicament rellevants. La sobreexpressió de l'AZ i l'increment de l'activitat SSAT són els dos mecanismes cel·lulars més importants per evitar l'acumulació de nivells tòxics de PA. L'expressió forçada de l'AZ en queratinòcits malignes va provocar la reversió del fenotip, induint, alhora, la diferenciació epitelial i la desmetilació de l'ADN (Tsuji *et al.* 2001), mentre que en la pell de ratolins transgènics va reduir la inducció de l'ODC causada per un promotor tumoral i la susceptibilitat a la carcinogènesi química (Feith *et al.* 2001). Quan l'AZ es va sobreexpressar en cèl·lules prostàtiques epitelials immortalitzades els nivells d'espermidina i espermina van disminuir lleugerament, però els de putrescina van disminuir 3 vegades (Scorcioni *et al.* 2001). Això va conduir a una acumulació de cèl·lules en fase S, tal i com succeeix en cèl·lules amb deficiència de PA (Fredlund i Oredsson 1996a, Fredlund i Oredsson 1996b). De totes formes, l'expressió de l'AZ no és necessària per a la viabilitat cel·lular. Els ratolins *knock-out* AZ són viables, morfològicament normals i fèrtils malgrat que presenten una mortalitat perinatal elevada (Coffino 2001a, Coffino 2001b).

La concentració de PA està considerada, generalment, com el factor més important en la regulació de la síntesi d'AZ. El mecanisme d'inducció que empren es diu canvi de pauta ribosomal programat ([angl.] *programmed ribosomal frameshifting*) (Matsufuji *et al.* 1995). L'ARNm-AZ conté dues pautes de lectura oberta. La segona codifica la major part de la proteïna però li manca un codó d'iniciació. La traducció comença en la pauta 1 i ha de canviar necessàriament a la pauta 2 per produir un AZ funcional. Les PA incrementen l'eficiència d'aquest canvi abans de que es completi la traducció de la primera pauta. La seqüència de canvi de pauta en els AZ 1 i 2 de mamífer és UCCUGA: just abans d'arribar al codó stop UGA es produeix una translocació del quadruplet UCCU per canviar la lectura a la pauta +1 (Matsufuji *et al.* 1995, Ivanov *et al.* 1998b). El canvi de pauta eficient requereix que la base 3' del quadruplet sigui la primera base del codó stop. Altres trets importants són un pseudonus just a 3' de la seqüència de canvi i una seqüència específica a 5' (Matsufuji *et al.* 1995, Ivanov *et al.* 1998b, Ivanov *et al.* 2000a). Cap dels elements cis sembla intervenir en la inducció del canvi de pauta per les PA. Més aviat és la pròpia maquinària de traducció (el ribosoma o algun dels seus components) qui interacciona amb les PA i l'ARNm-AZ (Matsufuji *et al.* 1995, Ivanov *et al.* 2000a).

La putrescina, l'espermidina i l'espermina exògenes indueixen el canvi de pauta quan l'ARNm-AZ de rata es tradueix *in vitro* en lisat de reticulòcit de conill (Matsufuji *et al.* 1995). Les concentracions òptimes són: 0,12 mM (espermina), 0,8 mM (espermidina) i 4 mM (putrescina). Les PA poden incrementar un 30% l'eficiència del canvi de pauta i estimular-ho 10 vegades per sobre dels nivells obtinguts sense addició de PA. L'agmatina, un metabòlit bioactiu de l'arginina, també indueix el canvi de pauta de forma eficient (Satriano *et al.* 1998).

Poques coses més es coneixen sobre la regulació de l'AZ. Un element de regulació específic de l'AZ, anomenat inhibidor de l'antienzim, es descriu a l'apartat següent. En cèl·lules Caco-2, l'addició de glicina inhibeix l'activitat de l'AZ i simultàniament augmenta 4



vegades la vida mitjana de l'ODC (Chabanon *et al.* 2000), mentre que la privació d'AA disminueix un 16-29% els complexos ODC/AZ (Aubel *et al.* 1999). En cèl·lules de melanoma humà, l'interleucina-1 provoca un augment en la transcripció de l'AZ (Yang *et al.* 1997). La depleció de PA provoca una forta disminució en la transcripció del gen AZ mentre que els nivells alts no modifiquen l'ARNm-AZ (Nilsson *et al.* 1997). L'estrès osmòtic modifica els nivells cel·lulars d'AZ: disminueixen en medi de creixement hipotònic i s'incrementen en medi hipertònic (Mitchell *et al.* 1998a). Aquesta regulació sembla ocórrer via alteracions en l'estabilitat de l'antienzim. Recentment, Bettuzzi *et al.* (1999) han reportat que la transcripció de l'AZ sembla estar coordinada amb el cycle cel·lular.

Tal i com succeeix amb l'ODC i la SAMDC, l'expressió de l'AZ pot presentar alteracions en el càncer. Tsuji *et al.* (1998) van reportar una disminució en els nivells d'ARNm-AZ i un allargament simultani de la vida mitjana de la proteïna ODC en queratinòcits malignes vs. normals. Els autors van suggerir que el silenciament del gen podria implicar la desregulació de la proliferació cel·lular en els tumors orals. Per altra banda, investigacions en el càncer de pròstata han assignat un paper decisiu a l'espermina en el creixement d'aquests tumors. L'alta presència d'aquesta PA en el fluid seminal podria explicar el creixement ultralent dels tumors confinats a l'òrgan primari. Estudis *in vitro* demostren que l'addició de PA a cultius primaris de cèl·lules de carcinoma de pròstata suprimeix el creixement cel·lular de cèl·lules amb poca capacitat de metastasi i amb un AZ funcional, mentre que cèl·lules metastàtiques que per alguna raó no poden induir l'AZ són resistents a aquesta inhibició del creixement (Koike *et al.* 1999). Resultats no publicats suggereixen que algunes ciclines i cinases dependents de ciclines podrien ser dianes de l'AZ (Coffino 2001b). Això implicaria que els AZ no només regulen el metabolisme de les poliamines sinó processos més amplis, relacionats amb el creixement i el cycle cel·lular. Mosbacher *et al.* (2000) utilitzant un sistema *in vitro* amb l'AZ, el proteosoma 26S i la ciclina D1 o la CDC4 van obtenir evidències de que aquestes últimes són substrat per la degradació mediada per AZ. Recentment, Gruendler *et al.* 2001 van observar que Smad1, un mediador en la via de senyalització dels TGF- $\beta$  sobre la proliferació, la diferenciació i l'apoptosi cel·lular, també s'uneix a l'AZ i queda assenyalat per proteòlisi.

## 1.4 L'inhibidor de l'antienzim

El descobriment d'un factor capaç de recupera l'activitat ODC inhibida per l'AZ en extractes de fetge de rata (Fujita *et al.* 1982) va aportar un grau més de complexitat en la regulació d'aquest enzim, diferenciant-lo encara més de la resta de sistemes descrits fins ara. Els coneixements que tenim d'aquest regulador secundari anomenat l'inhibidor de l'antienzim (AZI), són, però, molt limitats. És una proteïna de pes molecular similar a l'ODC, però sense activitat enzimàtica, amb una propietat distintiva: una afinitat per l'antienzim superior a la del monòmer de l'ODC, que li permet substituir-lo en els complexos ODC/AZ i alliberar subunitats funcionals d'enzim. La seva expressió sembla estar relacionada amb el creixement ja que s'indueix ràpidament en fibroblasts estimulats i el seu transcrit és molt més abundant en els tumors gàstrics que en el teixit normal (Jung *et al.* 2000).

Un fet interessant dels AZI és que les proteïnes de diferents espècies presenten un 50% d'identitat en la seqüència d'aminoàcids amb els seus ODC corresponents (Murakami *et al.* 1996, Nilsson *et al.* 2000). El domini d'unió a l'AZ encara presenta major identitat, un 71%. Aquest alt grau d'homologia suggereix la possibilitat de que l'AZI s'originés, en algun punt de l'evolució, a partir de la duplicació del gen de l'ODC i de posteriors mutacions destinades a suprimir la capacitat de descarboxilar ornitina i a augmentar l'afinitat de la molècula per l'AZ. A mida que progressen els estudis estructurals per caracteritzar el mecanisme catalític de l'ODC es van coneixent quins són els aminoàcids implicats en la descarboxilació de l'ornitina. Quinze residus han estat identificats fins el moment. Lu *et al.* (1991) van reportar l'abolició de l'activitat ODC en mutants K169A i H197A. Posteriorment, Kern *et al.* (1999) van demostrar que la lisina K169 forma un pont salí implicat en l'estabilització del dímer ODC, mentre que H197 podria ser un donador de protons. K69 és el residu que forma una base de Schiff amb el cofactor fosfat de piridoxal (Poulin *et al.* 1992) i intervé en el posicionament del substrat per garantir una descarboxilació eficient (Osterman *et al.* 1999). K69 i C360 formen adductes amb DFMO indicant la seva pertinença o proximitat al centre actiu de l'enzim (Tsirka i Coffino 1992). Les subunitats ODC no són funcionals individualment, només el dímer d'ODC té la capacitat de descarboxilar l'ornitina. Tobias i Kahana (1993) van demostrar que l'enzim té dos centres actius a la interfase entre les subunitats: cadascun es forma amb la regió que conté K69 d'una subunitat i la regió que conté C360 de l'altra. La mutació K115R condueix a una pèrdua substancial d'activitat (Coleman *et al.* 1994). Els residus D88, E94, D233 i E274 formen part del centre actiu i són aportats pel domini que conté K69 (Osterman *et al.* 1995). E274, en particular, es va identificar com el residu que estabilitza la càrrega de N<sub>1</sub> de la pirimidina del cofactor. En el domini que conté C360, els residus àcids D361 i D364 també són imprescindibles en l'arquitectura del centre actiu. D361, en concret, és un determinant de la unió a substrat (Osterman *et al.* 1995). Els residus 235-237 formen un bucle ric en glicina, involucrat en l'estabilitat del grup fosfat del cofactor (Grishin *et al.* 1995). Finalment, mitjançant estudis de mutagènesi dirigida i espectroscopia, Osterman *et al.* (1997) van demostrar que R277 contribueix a la unió d'alta afinitat del cofactor mitjançant una interacció directa amb el fosfat 5' del fosfat de piridoxal. Molt notablement, només dos d'aquests quinze residus descrits, D88 i R277, són diferents en l'AZI.

## 1.5 La síndrome de l'intestí curt

La síndrome de l'intestí curt (SIC) és un desordre caracteritzat per la malabsorció de nutrients que resulta d'una resecció massiva del budell prim. La malaltia de Crohn és la causa més comuna per la resecció del budell prim en adults. Depenent de la longitud i l'estat de l'intestí remanent, així com de la presència o absència de vàlvula ileocecal o còlon, aquests pacients poden requerir des de canvis en la dieta, suplementos orals i fluids intravenosos fins a la nutrició parenteral total i medicació per aliviar els símptomes (Westergaard 1998). La longitud del budell pot ser difícil de determinar perquè els mètodes utilitzats habitualment com l'estudi de contrast amb sulfat de bari i la mesura intraoperativa són imprecisos. A més, hi ha variacions intraindividuals significatives en la resposta

adaptativa a diferents longituds de l'intestí residual. Els individus joves, especialment els neonats, tenen una capacitat d'adaptació molt superior a la dels adults. La SIC és potencialment fatal, essent la diarrea el símptoma principal. D'altres símptomes inclouen torçons, inflor i coragre. Molts pacients SIC pateixen malnutrició per què el seu budell prim remanent és incapaç d'absorbir suficient aigua, vitamines i d'altres nutrients dels aliments. Les complicacions de la SIC inclouen la deshidratació (que pot resultar en nefrolitiasi d'àcid úric), l'alteració del balanç d'electròlits, deficiències nutricionals específiques, nefrolitiasi d'oxalat de calci i colelitiasi. Aquells pacients amb una malabsorció important, que requereixi nutrició parenteral a llarg termini, estan en risc adicional d'esteatosi hepàtica (fetge gras) i colèstasi amb progressió potencial a cirrosi, colecistitis, malaltia òssia metabòlica, nefropatia, i problemes relacionats amb el catèter venós central, incloent infecció i oclusió (Buchman i Sellin 2001). En els pacients jejunostomitzats, a més, apareixen tota una sèrie de problemes en la qualitat de vida associats amb l'ostomia.

Inicialment molts pacients resecats requereixen nutrició parenteral al començament de la SIC però, com a resultat d'un fenomen d'adaptació intestinal, alguns poden fer una transició a una dieta modificada amb suplement de vitamines, minerals i medicaments per optimitzar l'absorció intestinals i eventualment assolir una adaptació total. L'adaptació intestinal en el budell remanent ha estat estudiada a fons en models animals i de forma limitada en humans (per una revisió recent veure Jeppesen i Mortensen 2002). És un fet conegut que quan es reseca el jejú, l'ili (aproximadament 3/5 del budell prim final) experimenta una adaptació estructural i funcional. L'adaptació estructural es fa aparent a mida que el budell s'incrementa en amplada, els seus villi es fan més llargs i les criptes intestinals més profundes. L'adaptació funcional s'evidencia mesurant increments (amb el temps o comparats amb subjectes normals) en l'absorció de macro- i/o micronutrients al llarg d'un segment de budell de longitud definida. L'adaptació funcional pot ser el resultat de canvis estructurals, un alentiment del trànsit intestinal o d'events moleculars a nivell intracel·lular (p.ex., increments en el transport i les activitats enzimàtiques). Molts factors ajuden a l'adaptació ilial, incloent nutrients luminals, secrecions pancreatobiliars i hormones gastrointestinals.

Malauradament, els pacients amb un intestí curt que es troben en la pràctica clínica comuna no poden retenir l'ili, i presenten o bé una anastomosi jejunocòlica o bé una jejunostomia. L'adaptació jejunal en rates ocorre si el còlon es perfundeix amb nutrients, mentre que en humans les evidències són escases. Pot haver-hi una petita reducció en el pes de la femta durant els tres mesos posteriors a la resecció tant en pacients amb còlon com en pacients amb una jejunostomia. En els primers hi ha molt poques evidències d'adaptació estructural i funcional (Nightingale 1999a). En els segons no existeix cap evidència convincent d'adaptació (Nightingale 1999b). L'estudi dels factors tròfics intestinals involucrats en l'adaptació del budell pot ajudar a entendre com accelerar aquest procés, disminuint la necessitat de nutrició parenteral en alguns pacients SIC.



## **Objectius del present estudi**

1. Establir uns valors de referència d'espermidina i espermina en eritròcits en subjectes sans. Investigar els perfils de PA eritrocitàries en pacients amb la síndrome de l'intestí curt.
2. Avaluat la capacitat antioxidant de les PA en els eritròcits.
3. Examinar l'estat del metabolisme de les PA en la mucosa intestinal de pacients jejunostomitzats amb la síndrome de l'intestí curt.
4. Estudiar l'expressió de la proteïna de l'AZ i de l'ARNm de l'ODC en tumors colorectals humans.
5. Determinar si les mutacions A88D i S274R poden conferir activitat ornitina descarboxilasa a l'AZI.

## 2 Materials i mètodes

## 2 Materials i mètodes

### 2.1 Materials

#### 2.1.1 Reactius i instrumental

Taula 2.1. Reactius de laboratori

<b>Reactius de cromatografia HPLC</b>	
<i>Reactius de grau fluorimètric</i>	
Acetonitril	Fisher
6-quinolinilcarbamat de <i>N</i> -hidroxisuccinimidil	Waters
<i>Reactius de grau HPLC</i>	
Acetat sòdic	Fisher
Trietilamina	Romil
Metanol	Merck
<i>Reactius de grau Analític</i>	
Diclorur d'ornitina	Sigma
Diclorur de putrescina	Sigma
Triclorur d'espermidina	Sigma
Tetraclorur d'espermina	Sigma
Diclorur de 1,7-diaminoheptà	Sigma
Àcid fosfòric	Merck
Àcid clorhídric	Merck
Tetrahidrofurà	Merck
Hidròxic sòdic	Merck
Etanol	Merck
<i>N,N</i> -Dimetilformamida	Merck
Gel de sílice	Riedel-de Haënle
Àcid sulfúric	Merck
Àcid tricloroacètic	Merck
Àcid perclòric	Merck
Heli	Air Liquide
Nitrogen	Air Liquide
<b>Reactius per cultius cel.lulars</b>	
<i>Medis de cultiu</i>	
DMEM amb piruvat, glucosa i piridoxina	Gibco
RPMI 1640	Gibco
Sèrum fetal boví	Gibco
<i>Reactius de grau Cultiu Cel.lular</i>	
Tripsina	Gibco
Penicil.lina	Gibco
Estreptomicina	Gibco
<b>Reactius per determinar peroxidació lipídica</b>	
<i>Reactius de grau Analític</i>	
Peròxid d'hidrogen	Sigma
Dextrà (pes molecular ~580.000)	Sigma
Àcid tiobarbitúric	Sigma
<b>Reactius per determinar proliferació cel.lular</b>	
Kit de proliferació cel.lular per ELISA Biotrak2	Amersham
<i>Reactius de grau Analític</i>	
Aminoguanidina	Fluka
Àcid sulfúric	Merck

<b>Reactius per determinar activitat ornitina decarboxilasa</b>	
<i>Reactius de grau Radioisotòpic</i>	
D,L-[1- <sup>14</sup> C]ornitina	New England Nuclear
<i>Reactius de grau Analític</i>	
Ornitina-2HCl	Sigma
Proteïna ODC d' <i>E. coli</i> purificada	Sigma
Reïna Dowex 50 Wx4, 100-200 mesh	Serva
Fosfat de piridoxal; PLP	Sigma
Triton X-100	Sigma
Fluorur de fenilmetilsulfonil	Boehringer
Tris-HCl	Merck
Àcid etilenodiamina tetraacètic; EDTA	Sigma
Ditiotreitòl; DTT	Amersham
Solució NCS	Amersham
Líquid de centelleig Optiphase	IMC
<b>Reactius per determinar activitat diamina oxidasa</b>	
<i>Reactius de grau Radioisotòpic</i>	
[1,4- <sup>14</sup> C]putrescina	New England Nuclear
<i>Reactius de grau Analític</i>	
Putrescina-2HCl	Sigma
Toluè	Merck
Fosfat sòdic dibàsic	Sigma
Fosfat potàssic monobàsic	Sigma
Líquid de centelleig Ecolume	Amersham
<b>Reactius per determinar ARNm-ODC i ARNm-AZ per Northern blot</b>	
<i>Kits de Biologia Molecular</i>	
RNeasy (extracció d'ARN total)	Qiagen
Megaprime Random Labeling (marcatge de sondes)	Boehringer
<b>Reactius per determinar ARNm ODC per anàlisi Northern-ELISA</b>	
<i>Kits de Biologia Molecular</i>	
Northern Enzyme-linked Immunosorbent Assay	Boehringer
PCR DIG Probe Synthesis	Boehringer
mRNA Isolation	Boehringer
<i>Reactius de grau Biologia Molecular</i>	
Ultraspec	Pharmacia
Ready-to-Go RT-PCR beads	Sigma
<b>Reactius per determinar ARNm-ODC per PCR a temps real</b>	
<i>Kits de Biologia Molecular</i>	
High Pure RNA Tissue (extracció d'ARN)	Roche
Purificació de productes de PCR	Qiagen
<i>Reactius per PCR a temps real</i>	
Barreja de reacció 1 x Light Cycler RT-PCR	Roche
Sondes 2,7 x LC-RNA Master Hybridization Probes	Roche
Barreja de reacció 2,7 x Light-Cycler RT-PCR	Roche
Sondes i primers comercials per ARNm-GADPH	Roche
Sondes i primers comercials per ARNm-PBGD	Roche
<i>Reactius de grau Biologia Molecular</i>	
Enzim de restricció <i>Hpa</i> I	Roche
T7 ARN polimerasa	Roche
ADNasa I	Roche
Clorur de magnesi	Sigma
Fenol	Sigma
Cloroform	Sigma
Etanol	Sigma

<b>Reactius per determinar proteïna AZ per anàlisi Western blot</b>	
<i>Reactius de grau Biologia Molecular</i>	
Cocktail inhibidor de proteases Mini	Roche
Anti-IgG de conill conjugat amb peroxidasa	Amersham
Substrat quimioluminiscent ECL Plus	Amersham
Substrat quimioluminiscent SuperSignal WestFemto	Pierce
Tween-20	Amersham
Nonidet-40	Amersham
<b>Reactius per determinar proteïna ciclina D1 per anàlisi Western blot</b>	
<i>Reactius de grau Biologia Molecular</i>	
Anticòs monoclonal anticiclina D1 humana	Calbiochem
Anticòs anti-ratolí conjugat amb peroxidasa	Amersham
<b>Reactius per expressar i purificar proteïnes AZI recombinants</b>	
<i>Kits de Biologia Molecular</i>	
Gene-Editor Site-directed mutagènesi	Promega
<i>Kits de Seqüenciació</i>	
Big Dye Terminator	Perkin Elmer
<i>Reactius de grau Biologia Molecular</i>	
Enzim de restricció NdeI	Promega
Vector pET-19b	Novagen
Vector pGEM-T	Promega
Cèl.lules competents d' <i>Escherichia coli</i> JM109	Promega
Medi Luria Bertoni	Sigma
Carbencilina	Sigma
Isopropiltio- $\beta$ -D-galactòsid	Sigma
Lisozim	Sigma
Imidazol	Merck
Glicerol	Amersham
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma

**Taula 2.2 Oligonucleòtids per PCR**

<b>ARNm-ODC per anàlisi Northern-ELISA</b>		
<i>Primers</i>		
NE	ODC sentit	5'-AAgCATCTgAggTggCTAAA-3'
NE	ODC invers	5'-CTCCgTACTggCAGCATAc-3'
<b>ARNm ODC per PCR a temps real</b>		
<i>Primers</i>		
P1	HpaI-ODC sentit	5'-TgACgTAACTgATTgATgCTCTTTgAAAACAT-3'
P2	T7-ODC invers	5'-CgAAATTAATACgACTCACTATAgggAgAACACATTAATACTAgCCgAAgCAC-3'
P3	ODC sentit	5'-TgATTggATgCTCTTTgAAAACAT-3'
P4	ODC invers	5'-ACACATTAATACTAgCCgAAgCAC-3'
	GADPH sentit	5'-CCCATCACCATCTTCCAggA-3'
	GADPH invers	5'-ATgACCTTgCCCACAgCCT-3'
<i>Sondes</i>		
	ODC fluoresceïna	5'-TggAATTgCTgCATgAgTTgCCAC-3'
	ODC LC Red640	5'-TgCCCTgACATCACATAgTAgATCgTCggC-3'
	GADPH fluoresceïna	5'-CATgACCACAgTCCATgCCATCACTgC-3'
	GADPH LC Red640	5'-CCAgAAgACTgTCgATggCCCCCT-3'
<b>Mutagènesi dirigida de l'AZI</b>		
<i>Primers</i>		
	A88D	5'-ggAACTgggTTTgATTgTTCCAgCAA-3'
	S274R	5'-TCAgAACCTggAAgATACTATgTATCT-3'



## **Instrumental**

### *Instrumental de laboratori*

Les mesures de colorimetria es van fer en un fotòmetre per plaques de microtitulació EIA-R400 (Invesgen) i en un espectrofotòmetre SP-830 (Dinko). Tot l'instrumental emprat per la tècnica del Western blot va ser de BioRad. Les centrífugues utilitzades van ser els models Digicen (Alresa), Micromax (IEC), Biofuge-13 (Heraeus) i 5417R (Eppendorf). Les mesures de pH es van fer en un pH-metre micropH 2002 (Crison). Per homogeneïtzar les mostres es va utilitzar un agitador Reax 2000 (Heidolph). Els banys d'aigua emprats van ser els models Precistern i Unitronic 320 OR amb agitació (ambdós de JP Selecta).

### *Sistema cromatogràfic*

El sistema de cromatografia on es va desenvolupar el mètode de quantificació de poliamines tenia quatre components bàsics: (1) un sistema de bombeig de líquids d'HPLC model 525 (Kontron), (2) un espectrofluorímetre model SFM25 (Kontron), (3) un sistema de desgasificació de líquids amb Heli N55 i (4) un programa informàtic de recollida i tractament de dades cromatogràfiques 712 HPLC Controller, versió 1.2 (Gilson). Les mostres es van introduir en el sistema amb una vàlvula d'injecció manual model 7125 (Rheodyne). La separació cromatogràfica es va realitzar en columnes C<sub>18</sub> de fase inversa, amb partícules de sílice de 5 µm i 100 Å de grandària de porus (Teknokroma). Es va utilitzar una cèl.lula de flux per fluorescència amb una passa de llum de 1 mm (Hellma) per captar el senyal dels analits que sortien de la columna. El senyal analògic del detector fluorimètric es va digitalitzar utilitzant una interfase 506C (Gilson). Els solvents cromatogràfics es van filtrar amb un equip de filtració al buit (Supelco).

### *Cultiu de cèl.lules*

Pel cultiu de cèl.lules es va fer servir un incubador de CO<sub>2</sub> Ultima (Revco), una campana de flux laminar AV-100 (Telstar) i un microscopi invertit IMT-2 (Olympus).

### *Cultiu de bacteris*

Pel cultiu de bacteris es va fer servir un agitador orbital amb calefacció Rotaterm (JP-Selecta) i una centrífuga J-30I Avanti (Beckman).

### *Recompte de radioactivitat*

El recompte de la radioactivitat en les mostres es va fer en comptadors de centelleig Tri-Carb 1500 (Packard) i LS-5801 (Beckman).

### *PCR estàndar*

Les reaccions d'amplificació PCR es van realitzar en termocicladors Gene Amp 2400 (Applied Biosystems).

### *PCR a temps real*

Les dades de PCR quantitativa es van generar amb un LightCycler (Roche).

### *Seqüenciació d'ADN*

Les seqüències de fragments d'ADN es van obtenir amb un analitzador genètic ABI Prism 310 (Perkin Elmer).

### *Purificació de proteïnes*

Les proteïnes recombinats mutants de l'AZI es van purificar en un sistema cromatogràfic Econo de Biorad.

## 2.1.2 Cèl.lules

### CT-26

La CT-26 és una línia de cèl.lules de carcinoma de còlon establerta a partir d'un tumor transplantable induït químicament amb metilnitrosouretà intrarectal en ratolins (Brattain *et al.* 1980). La formació de tumors al còlon en humans, a diferència d'altres malalties neoplàsiques, pot ser reproduïda de forma efectiva en models experimentals animals puix que es considera que la inducció química és el mecanisme de carcinogènesi implicat, enlloc de tenir un origen espontani (Weisburger 1971). El metilnitrosouretà pertany a la família de la cicasina, un grup de compostos amb els motius N-N-CH<sub>3</sub> o N=N-CH<sub>3</sub> a la seva estructura que presenten una gran activitat carcinogènica en teixit colònic i rectal. Les línies cel.lulars derivades de tumors induïts amb aquestes substàncies s'utilitzen com a model *in vitro* de càncer de còlon metastàtic. Les seves propietats biològiques i farmacològiques es consideren representatives de l'ampli espectre de propietats que mostren els carcinomes colorectals humans (Narvaiza *et al.* 2000). Alguns aspectes del paper de les poliamines en la formació d'aquests tumors experimentals han estat estudiats. Per exemple, l'administració de DFMO redueix la incidència de tumors induïts per dimetilhidrazina en ratolins (Kingsnorth *et al.* 1983), mentre que incrementar el contingut de PA en la dieta de rates tractades amb azoximetà (iniciador) promou el creixement de *foci* aberrants en les criptes intestinals (Paulsen *et al.* 1997).

Nosaltres vam utilitzar aquesta línia de cèl.lular, subministrada pel Dr. Habib Fakhrai del Sidney Kimmel Cancer Center de San Diego (EEUU), per posar al punt un mètode d'HPLC per quantificar poliamines. En comprovar la robustesa del sistema experimental, vam treballar amb ell per determinar si la inducció de la proliferació cel.lular de la putrescina en cèl.lules de càncer de còlon estava mediada per l'acció del diamina oxidasa (DAO). També vam caracteritzar com afecta l'aport de putrescina en quantitats fisiològiques a l'activitat ODC i les concentracions de PA intracel.lulars.

### K-562

Els blasts K-562 son cèl.lules hematopoiètiques multipotencials malignes que es poden diferenciar en progenitors de les sèries eritrocítica, granulocítica i monocítica. Una línia contínua fou establerta a partir de l'efusió pleural d'una pacient de 53 anys amb leucèmia mielogènica crònica en fase aguda terminal (Lozzio i Lozzio 1975). Són cèl.lules que poden desenvolupar resistència a DFMO mitjançant ampliació gènica: en presència de 20 mM d'aquest inhibidor es genera una sublínia de cèl.lules resistents, K-562/D20, que amplifica 8 vegades el nombre de còpies del gen de l'ODC, sobreexpressa la proteïna ODC i aconsegueix mantenir una activitat enzimàtica normal (Ask *et al.* 1993).

Dos dels problemes que apareixen en l'estudi de l'ODC i l'AZ en sistemes biològics són la transitorietat i la baixa magnitud de la seva expressió. Amb la intenció d'estudiar la interacció d'un anticòs anti-AZ de ratolí (AZr) amb la proteïna AZ intestinal humana (AZh) vam seleccionar aquestes cèl.lules ja que presentaven un rang d'expressió d'ODC

ampli i fàcilment manipulable, el qual, *a priori* porta associats grans canvis en l'expressió de l'AZ. La sublínia K-562/D20 va ser utilitzada per comprovar la sensibilitat de l'assaig. Les cèl·lules es van obtenir de l'American Type Culture Collection.

## **Caco-2**

La línia cel·lular Caco-2 fou establerta a partir d'un adenocarcinoma de còlon moderadament diferenciat obtingut d'un pacient de 72 anys (Fogh *et al.* 1977). Caco-2 és l'única línia de cèl·lules d'epiteli intestinal que es diferencia espontàniament en cultiu mostrant característiques pròpies dels enterocits del budell prim. És un model d'epiteli intestinal *in vitro* fisiològicament rellevant, especialment en l'estudi del transport de nutrients (des de la incorporació d'ions fins a la producció i secreció de lipoproteïnes). En els cultius de Caco-2 la diferenciació és un procés relacionat amb el creixement que depèn de la densitat cel·lular i comença tan bon punt s'assoleix la confluència. La diferenciació és, a la vegada, estructural i funcional. Es produeix una polarització de la monocapa epitelial (quan les cèl·lules es fan créixer sobre filtres de policarbonat una de les cares de la membrana cel·lular es recobreix de microvilli orientats perpendicularment que es diferencien funcionalment). Es formen unions ajustades ([angl.] *tight junctions*) entre cèl·lules i els cultius formen de voltes ([angl.] *domes*) per augmentar la superfície total de la monocapa (Pinto *et al.* 1983). L'avenç de la diferenciació funcional es pot seguir per les activitats de diferents enzims propis de l'epiteli intestinal, com p.ex., la fosfatasa alcalina, la sucraza-isomaltosa o l'aminopeptidasa N.

En aquesta tesi, les Caco-2 (donades per la Dra. Gritli-Linde de la universitat de Göteborg (Suècia)) es van utilitzar per posar al punt un mètode d'HPLC per quantificar poliamines, i per optimitzar un assaig Western blot per mesurar l'expressió d'AZ en mostres intestinals humanes.

### **2.1.3 Subjectes**

La natura, el propòsit i els riscos potencials dels estudis humans van ser explicats a tots els pacients abans de que consentissin en participar. Els protocols d'estudis en humans van ser aprovats pels comitès d'ètica de l'Hospital Vall d'Hebron (HVH) (Grups I i III) i de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge (CSUB) (Grup II).

#### **GRUP I**

##### **Persones sanes**

Es van realitzar dos estudis en persones sanes. En el primer, es van establir uns valors de referència de poliamines en sang a partir d'una mostra de població que acudia a l'HVH per fer-se una analítica preoperatòria per una intervenció d'Otorinolaringologia. En el segon, es va estudiar l'efecte de les poliamines en la peroxidació lipídica de la membrana eritrocitària en un grup de voluntaris sans.

##### **GRUP I.A: Valors d'espermidina i espermina en sang en persones sanes**

La mostra de població normal es va obtenir reclutant pacients amb dismorfisme septal, apnea o hipoacúsia que acudien al servei de Bioquímica de l'HVH per una analítica preoperatòria abans de ser intervinguts mitjançant septoplastia, resecció palatal o estapedectomia respectivament durant 1999. Es van seleccionar individus majors de 18 anys i menors de 75 amb una distribució per grups d'edat i sexe semblant a la de la població de Catalunya: 30% entre 18-34 anys, 28% entre 35-49 anys, 26% entre 50-64 anys, 16% entre 65-75 anys; 51% dones vs 49% homes (Serra *et al.* 1996). Els criteris d'exclusió de l'estudi es van escollir fent una revisió dels coneixements disponibles sobre els processos fisiopatològics que alteren les concentracions de PA en la sang. Així doncs, es van excloure individus amb: una intervenció quirúrgica recent (Tsukamoto *et al.* 1997, Tsukamoto *et al.* 1999), malaltia cancerígena (von Essen *et al.* 1989, Ota *et al.* 1986, Cipolla *et al.* 1996, Bergeron *et al.* 1997), diabetis (Seghieri *et al.* 1992, Seghieri *et al.* 1997), malaltia hepàtica (Moulinoux *et al.* 1985), malaltia gastrointestinal (Villanueva i Mardon 1988), infecció activa (Pavlova *et al.* 1995, Mishra *et al.* 1997), fibrosi quística (Cohen *et al.* 1976) i tractament d'hemodiàlisi (Stabellini *et al.* 1998).

Del total de 82 individus inclosos inicialment a la mostra, 11 van ser descartats en una revisió retrospectiva del seu historial per complir algun del criteris d'exclusió, i 5 van ser descartats per errades en la presa de mostra o en el processament de dades. Finalment, 66 persones (31 dones i 35 homes) amb una edat mitjana de 37,3 anys van conformar la mostra d'estudi.

## **GRUP I.B: Efecte antiperoxidatiu de les poliamines en eritrocits de persones sanes**

Vint-i-dos voluntaris sans (13 dones i 9 homes) amb una edat mitjana de  $42 \pm 16$  anys van ser reclutats per realitzar aquest estudi. Es van recollir els valors dels paràmetres eritrocitaris per assegurar un status normal de les cèl.lules vermelles de la sang. Tots els individus van mostrar un recompte d'eritròcits i una concentració d'hemoglobina dintre dels rangs de normalitat. Cap d'ells havia estat malalt en els sis mesos previs a la presa de mostra. Addicionalment, vam estudiar un grup de 4 pacients amb patologies reconegudes com a causants d'un estat d'estrès oxidatiu, 24 h després de la seva admissió hospitalària. A la **Taula 2.3** es mostren les característiques d'aquests pacients.

**Taula 2.3 Característiques dels pacients amb estrès oxidatiu**

Cas	Edat/Sexe	Patologia	Eritròcits <sup>1</sup>	Hemoglobina <sup>2</sup>
1	53/F	Cremaures	4,5	13,5
2	31/M	Pneumònia	3,3	10,9
3	72/M	Pneumònia	2,7	8,7
4	70/F	Leucèmia	3,7	9,7

<sup>1</sup> [ $\times 10^{12}$  cèl.lules / dL]. <sup>2</sup> [g / dL]

## **GRUP II**

### **Pacients amb la síndrome de l'intestí curt**

Es van realitzar dos estudis en dos grups de pacients amb resecció intestinal tractats al servei d'Endocrinologia de la CSUB entre el setembre de 1998 i el setembre de 2000.

#### *Críteris d'inclusió i exclusió*

Els pacients seleccionats pels dos estudis presentaven un status nutricional normal o quasinormal, no patien cap malaltia digestiva activa i duïen una vida normal. Van ser exclosos els pacients amb malaltia neoplàsica activa, fallida renal crònica, infecció activa o malaltia hepàtica severa.

#### *Règim nutricional*

Els pacients es mantenien amb nutrició parenteral, nutrició oral i un suplement de dietes polimèriques. La nutrició parenteral es suministrava en forma de barrejes *all-in-one* amb tots els nutrients essencials en una única formulació, amb una pauta cíclica. El temps d'infusió eren 12-18 h amb un aport mig d'energia de  $620 \pm 105$  kcal/dia i un consum mig de N de  $6,2 \pm 1,4$  gr/dia. La nutrició oral consistia d'una dieta específica per a la síndrome de l'intestí curt (SIC) elaborada pel servei de Nutrició i Dietètica de la CSUB rica en proteïna, greix restringit i baix contingut en residu, lactosa i oxalat, amb la següent distribució respecte a l'energia total consumida: 20% de proteïna, 50-55% carbohidrats i 25-30% greix. Els pacients eren lliures per menjar tant com vulguessin.

## GRUP II.A: Nivells de poliamines en sang de pacients SIC

Nou individus (3 dones i 6 homes) amb una edat mitjana de 48 anys van prendre part en l'investigació. Cinc dels pacients havien superat la fase adaptativa postresecció (3 anys) mentre que els quatre restants eren considerats pacients en procés d'adaptació intestinal. A la **Taula 2.4** es mostra la malaltia primària, el temps transcorregut des de la resecció i el budell remanent dels subjectes.

**Taula 2.4 Dades clíniques del Grup II.A**

Cas	Edat	Temps resecció (mesos)	Malaltia primària	Jejú (cm)	Ili (cm)	Vàlvula ileocecal	Còlon
1	54	4	Trombosi mesentèrica	10	-	No	Esquerre
2	54	10	Embòlia mesentèrica	40	-	No	Esquerre
3	28	24	Trauma abdominal	40	-	No	Esquerre
4	64	29	Tumor colorectal	90	-	No	No
5	70	41	Tumor ginecològic	30	-	No	No
6	24	47	Trauma abdominal	15	-	No	Esquerre
7	41	73	Trauma abdominal	40	-	No	Esquerre
8	59	152	Vòlvulus mesentèric	15	10	Sí	Tot
9	38	166	Iatrogènesi ginecològica	20	10	Sí	Tot

## GRUP II.B: Cicle de les poliamines en la mucosa intestinal de pacients SIC amb jejunostomia

El grup d'estudi comprenia sis pacients (4 homes i 2 dones) amb una edat mitjana de 56 anys que havien superat la resecció del còlon, l'ili i part del jejú amb la subseqüent formació d'una jejunostomia. A la **Taula 2.5** es poden veure algunes característiques clíniques d'aquest pacients.

En aquest estudi es van incloure dos grups controls per determinar les variables d'estudi en el jejú (CJ;  $n = 6$ ) i en l'ili (CI;  $n = 13$ ) considerant que després de la resecció quirúrgica l'intestí remanent dels pacients SIC experimenta una sèrie de canvis funcionals i morfològics per intentar reemplaçar el segment perdut (Nightingale 1999). Els subjectes inclosos en els grups control van ser persones afectades d'un tumor gàstric (CJ) o colònic (CI) que van precisar d'una àmplia resecció intestinal. Tots ells van ser intervinguts al servei de Cirurgia Digestiva de la CSUB i van ser seleccionats per participar en l'estudi en funció dels següents criteris d'inclusió: tumor de tamany discret, detectat de forma precoç, capaç de mantenir una alimentació i un trànsit intestinal normals o quas normals abans de la intervenció.

**Taula 2.5 Dades clíniques del Grup II.B**

Cas	Edat/Sexe	Temps resecció (mesos)	Malaltia primària	Jejú (cm)	IMC <sup>1</sup> (kg/m <sup>2</sup> )
1	54/M	4	Embolia mesentèrica	50	26,1
2	50/M	6	Síndrome de Gardner	120	20,0
3	54/M	12	Trombosi mesentèrica	10	26,4
4	63/M	17	Tumor colorectal	50	24,2
5	43/F	18	Endometriosi	175	23,2
6	71/F	62	Tumor ginecològic	40	27,5

<sup>1</sup>IMC: índex de massa corporal.

### **GRUP III** **Pacients amb carcinoma colorectal**

Es van realitzar dos estudis en dos grups de pacients amb carcinoma colorectal tractats al servei de Cirurgia General de l'HVVH entre l'abril i el desembre de 2000.

#### **GRUP III.A: Expressió de l'antienzim en tumors de còlon**

En l'estudi de l'expressió de l'AZ en budell humà van participar cinc individus que havien estat diagnosticats d'una neoplàsia de còlon vegetant mitjançant colonoscòpia, dies abans de ser intervinguts quirúrgicament. A la **Taula 2.6** es mostren l'edat i el sexe dels pacients, i l'estadi TNM dels tumors malignes resecats.

**Taula 2.6 Característiques del grup III.A**

Cas	Edat/Sexe	Classificació TNM del tumor	Localització del tumor
1	79/M	T3 N0 M0	Còlon ascendent
2	69/F	T2 N0 M0	Còlon ascendent
3	68/M	T4 N0 M0	Còlon ascendent
4	60/M	T3 N2 M1	Còlon ascendent
5	66/M	T3 N1 M1	Còlon ascendent

#### **GRUP III.B: Expressió de l'ARN missatger de l'ODC en tumors colorectals**

Van participar nou subjectes amb un càncer colorectal (7 homes i 2 dones), amb una edat promig de 65,1 anys (rang 52-79) intervinguts mitjançant colectomia parcial. Les característiques clíniques d'aquests pacients es mostren a la **Taula 2.7**.



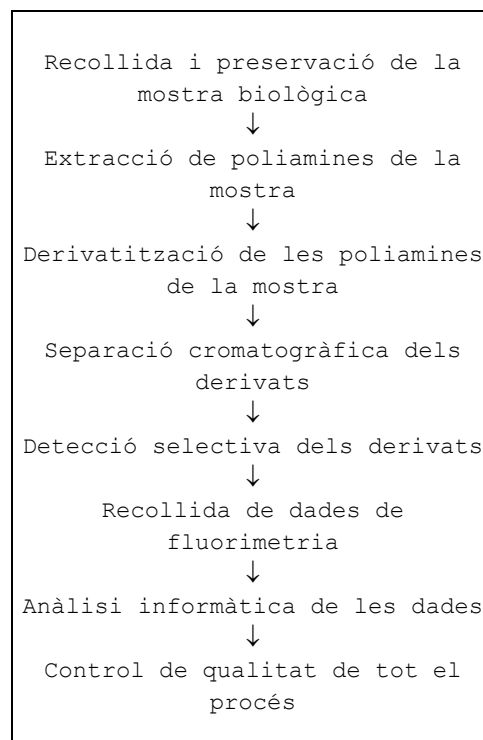
**Taula 2.7 Característiques del grup III.B**

Cas	Edat/Sexe	Classificació TNM del tumor	Localització del tumor
1	67/F	T1 N0 M0	Còlon ascendent
2	64/M	T3 N2 M0	Còlon ascendent
3	52/M	T3 N0 M0	Còlon descendent
4	63/M	T3 N0 M0	Sigma
5	68/F	T3 N1 M1	Sigma
6	56/M	T3 N2 M1	Còlon ascendent
7	69/F	T2 N0 M0	Còlon ascendent
8	79/M	T3 N0 M0	Còlon ascendent
9	68/M	T4 N0 M0	Còlon ascendent

## 2.2 Mètodes

### 2.2.1 Posada al punt d'un mètode d'HPLC per poliamines

El mètode d'HPLC per quantificar poliamines en cèl.lules, teixits i fluids biològics comprenia vuit etapes o processos (**Figura 2.1**). D'aquestes etapes només la primera no era susceptible d'automatització. De la resta, la segona i tercera eren treball del personal de laboratori, i les quatre últimes estaven automatitzades. El gruix del mètode (etapes de la segona a la quarta) es basava en el mètode de quantificació d'aminoàcids en hidrolitzats de proteïnes descrit per Cohen i Michaud (1993) considerant algunes modificacions introduïdes per Merali i Clarkson (1996) i per Weiss *et al.* (1997).



**Figura 2.1** Etapes del mètode d'HPLC.

Els mètodes de tractament de mostra emprats procedien de diferents fonts bibliogràfiques (Moulinoux *et al.* 1984, Ota *et al.* 1986, Catros-Quemener *et al.* 1997, Mach *et al.* 1981, Einarsson *et al.* 1983). Molts d'ells apareixen descrits al volum 94 del *Methods in Enzymology* dedicat a les poliamines (Tabor i Tabor 1983).

### **2.2.1.1 Tractament de la mostra**

Per poder analitzar les PA en mostres biològiques mitjançant derivatització amb un marcador fluorescent l'etapa clau consisteix en obtenir una solució aquosa homogènia, a un pH suauament alcalí i amb la mínima quantitat de molècules interferents en la reacció. Les mostres biològiques són matrius extraordinàriament complexes i heterogènies. Això implica que els mètodes d'extracció de PA de les mostres siguin diversos i específics per a cada tipus de mostra. En la determinació de PA lliures es necessari eliminar qualsevol tipus de macromolècula biològica i estructura cel·lular, així com pèptids i altres compostos de grandària petita. Per altra banda, les molècules petites amb característiques semblants a les PA o de difícil extracció (aminoàcids, amides, sucres, alcohols, etc...) són resoltes mitjançant tècniques d'elució en gradient al cromatògraf.

#### *2.2.1.1.1 Tractament de mostres de sang*

El 90% de les poliamines totals en sang circulen unides als eritròcits mentre que al sèrum els seus nivells són inferiors a 0,1 nmol/mL (Saeki 1978). Les concentracions habituals als eritròcits estan dintre d'un rang 5-50 nmol/mL per l'espermidina i l'espermina, mentre que els nivells de putrescina són quasi sempre indetectables. Aquestes concentracions són resultat tant de la síntesi endògena (en l'etapa de reticulòcit), com de la incorporació mitjançant receptors específics localitzats a la superfície de la membrana plasmàtica. El contingut de PA del plasma, per altra banda, és molt més complex d'interpretar perquè les PA circulen unides a lipoproteïnes i proteïnes plasmàtiques mitjançant diferents tipus d'enllaç (Roch *et al.* 1984).

#### PROTOCOL

Es recollien 4,5 mL de sang total anticoagulada amb citrat sòdic (16 mg en 0,5 mL) (Becton Dickinson) i es deixaven assolir la temperatura ambient del laboratori per evitar una hemòlisi prematura de la mostra. Es centrifugaven a  $1.500 \times g$ , 10 min. El plasma sobrenedant i la capa intermitga contenint els leucòcits i les plaquetes es retiraven amb una pipeta Pasteur, i els eritròcits es rentaven d'elements plasmàtics per resuspensió en 5 mL de NaCl 154 mM estèril, agitació per inversió i centrifugació a  $1500 \times g$ , 10 min tres vegades. De la suspensió homogènia resultant es prenia una alíquota de 200  $\mu$ L per fer el recompte d'eritròcits i una fracció de 1 mL per cromatografiar. Aquesta fracció s'etiquetava i es congelava a  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'alíquota de recompte es diluïa 1:3 amb una solució salina per obtenir una concentració de cèl·lules de l'ordre de  $10^{12}$  per mL. El recompte en el volum resultant es realitzava en un autoanalitzador Coulter. Per trencar els eritròcits, les mostres s'escalfaven i refredaven en un bany d'aigua a  $37^{\circ}\text{C}$  i en  $\text{N}_2(\text{l})$ , respectivament. La solució heterogènia resultant es centrifugava a  $21.000 \times g$  durant 20 min. El sobrenedant s'ultrafiltrava a través de membranes de cel·lulosa amb un límit màxim de pes molecular de 10.000, i la fracció ultrafiltrada s'emprava per l'anàlisi cromatogràfica.

## OPTIMITZACIÓ

Per comprovar l'eficàcia del mètode de lisi cel·lular mitjançant congelació/descongelació es van dur a terme observacions microscòpiques en mostres d'hematòcrit lisades i es va determinar la conveniència de fer un mínim de tres cicles per aconseguir un trencament total. L'etapa de desproteïnitzaació va ser més difícil d'optimitzar. El rang de pH pel qual la reacció del derivatitzador fluorescent 6-quinolinilcarbamat de *N*-hidroxisuccinimidil (QCHS) amb les tres PA té un rendiment superior al 90% és molt estret: 8,2-9,0 (Weiss *et al.* 1997). Es van tenir en compte dues consideracions a l'hora d'escollir un tractament àcid o bàsic per precipitar les proteïnes: (a) obtenir un pH final neutre o lleugerament àcid i (b) obtenir una solució sense grans concentracions de sals. Per una banda, el tampó borat de pH = 8,8 que es va fer servir per derivatitzar havia de ser capaç de portar el pH de la mostra tractada a dins del rang esmentat. Per altre banda, la presència de sals havia de ser mínima; no només per evitar interferències en la derivatització, sinó també per no introduir-les posteriorment en el cromatògraf, on podrien provocar un augment del soroll de la línia de base i una disminució en la sensibilitat de la detecció. Tenint això present, es van escollir els següents mètodes de desproteïnitzaació, trobats a la literatura, per a provar la seva eficàcia.

(1) *Desproteïnitzaació per calor.* Consistia en escalfar la mostra en un bany d'aigua a 100 °C durant 3 min. Un volum conegut de mostra es dipositava en un tub de 2 mL de polipropilè, i es tancava hermèticament per evitar l'evaporació del contingut aquós. A continuació, es centrifugava a  $21.000 \times g$  durant 20 min. Aquest mètode presentava dos avantatges: l'estalvi en la manipulació de la mostra i l'estalvi de temps. La manipulació esdevenia important quan s'introduïen canvis extrems en el pH de la mostra. L'aplicació de calor simplificava, *a priori*, el tractament de la mostra, i per tant, la seva optimització.

(2) *Desproteïnitzaació per precipitació amb una fase orgànica.* La barreja de volums iguals d'una mostra d'eritròcits i acetonitril pur provoca la precipitació immediata de proteïnes i altres components de les cèl·lules. La mostra es dipositava en un tub hermètic per evitar l'evaporació d'acetonitril. Per homogeneïtzar-la, es feia servir un vòrtex durant 1 min. Finalment, es centrifugava a  $8.000 \times g$  durant 30 min. Aquest mètode presentava uns avantatges semblants a l'anterior.

(3) *Desproteïnitzaació per precipitació en medi àcid.* Per provocar la precipitació de proteïnes es van provar diferents àcids forts no oxidants: l'àcid tricloroacètic, l'àcid sulfosalicílic i l'àcid perclòric. Per les raons abans esmentades sobre el pH i la presència de sals a la mostra, es va escollir l'àcid perclòric ja que el sobrenedant àcid resultant de l'extracció es podia neutralitzar i dessalar alhora amb una solució d'hidròxid potàssic. El precipitat blanc cristal·lí format es detectava i s'eliminava fàcilment.

La relació [mols d'àcid/volum d'empaquetat d'eritròcits] que es va considerar adient per a dur a terme la precipitació total de proteïnes va ser la descrita per Tsukamoto *et al.* (1997).

Aquesta relació va ser la més alta de les trobades a la bibliografia:  $1,62 \times 10^{-3}$  mols/mL. En el nostre cas, els volums apropiats són 270  $\mu\text{L}$  d'una solució d'àcid perclòric 3 M per cada alíquota de 500  $\mu\text{L}$  d'hematòcrit. Per tal de determinar el volum de solució de KOH 1,5 M necessari per neutralitzar la mostra es van dur a terme una sèrie de proves de valoració del pH.

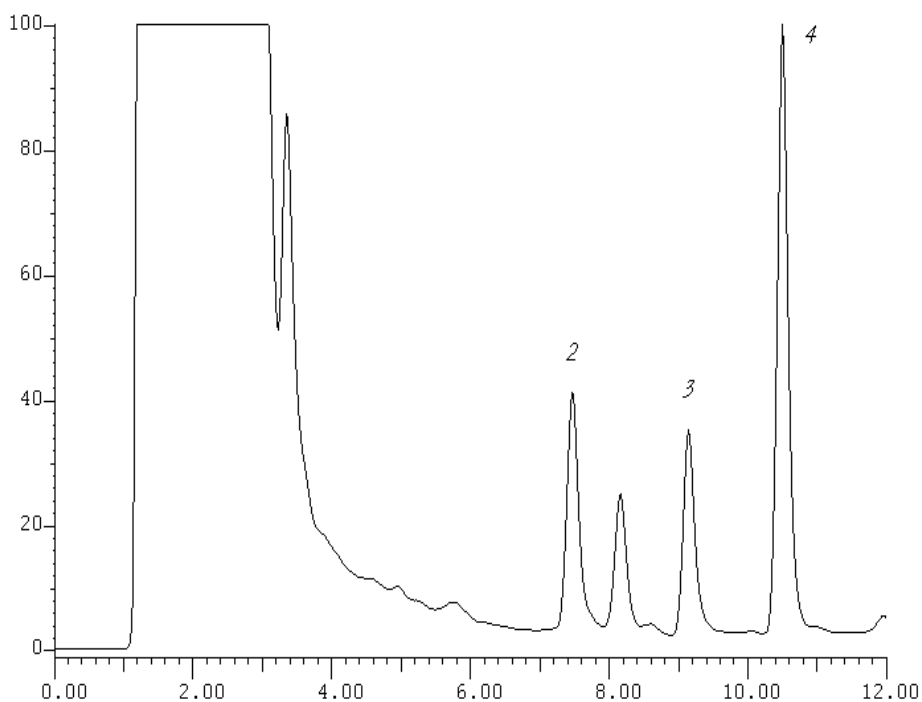
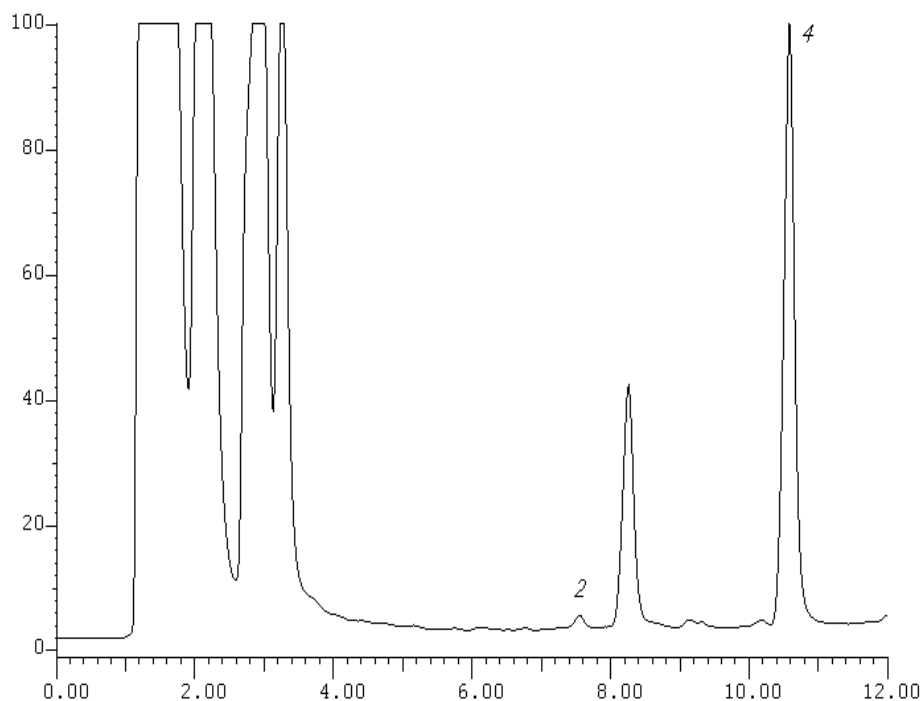


Figura 2.2. Mostra de sang tractada amb calor. 1: putrescina, 2: espermidina, 3:espermina i 4: 1,7-diaminoheptà (estàndard intern)

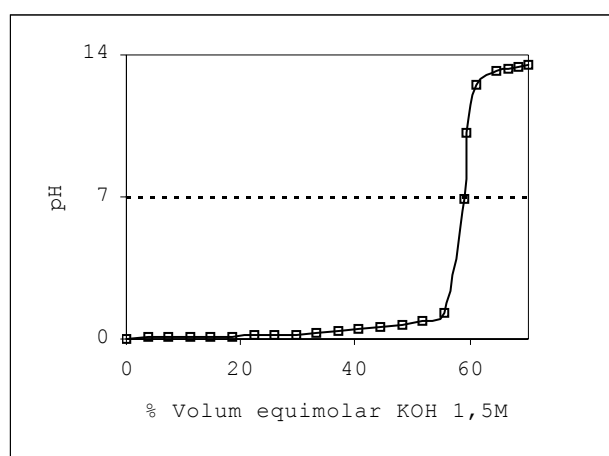
*Proves de valoració del pH.* Es va realitzar una prospecció inicial per veure quin era l'efecte d'afegir una quantitat equimolar de KOH al sobrenedant d'àcid perclòric un cop realitzada la desproteïnitació. Amb aquest propòsit, es van recollir els hematòcrits de 5 persones i es van homogeneïtzar formant una única mostra matriu, evitant així variacions interindividuais. D'aquesta mostra es van recollir alíquotes de 1 mL, i es van tractar amb 0,5 mL de perclòric 3 M durant 1 h a 0°C. Seguidament, els sobrenedants es van centrifugar i neutralitzar amb 1 mL de KOH. Després de 1 h a 0°C, els cristalls de  $\text{KClO}_4$  es van retirar per centrifugació. El sobrenedant es va tamponar amb 3 volums de tetraborat sòdic al 5%,  $\text{pH} = 8,72$ . Els valors de pH obtinguts en 5 replicats van ser entre 9,02 i 9,80. Si feiem servir la quantitat equimolar de KOH obtenim doncs un excés de  $\text{OH}^-$  lliures que el tampó de borat difícilment podia compensar, la qual cosa indica que el consum de  $\text{H}^+$  en la desproteïnitació no és negligible.

En una altra sèrie d'experiments es va determinar el punt final de la valoració del perclòric present als sobrenedants d'eritròcits amb una solució de KOH 1,5M (**Figura 2.4**).



**Figura 2.3.** Mostra de sang tractada amb acetonitril. 1: putrescina, 2: espermidina, 3:espermina i 4: 1,7-diaminoheptà (estàndard intern)

Per aquestes proves també es va partir d'una matriu formada per l'hematòcrit de cinc donants. Els resultats obtinguts indiquen que amb un 58%-60% de la quantitat equimolar de KOH s'aconsegueix neutralitzar les mostres.



**Figura 2.4** Corba de valoració d'una mostra de sang tractada amb PCA 3M i neutralitzada amb KOH 1,5M.

D'aquesta forma vam arribar a la següent relació:

500 µL hematòcrit / 270 µL HClO<sub>4</sub> 3 M / 320 µL KOH 1,5M

Els tres mètodes esmentats es van estudiar en diferents mostres d'hematòcrit. A les **Figures 2.2, 2.3 i 2.5** es poden veure els cromatogrames que resulten d'aplicar cadascun d'ells. La precipitació amb acetonitril va resultar ineficient per alliberar les PA (**Figura 2.4**) i es va descartar. La desproteïnitació per calor i la desproteïnitació per precipitació en medi àcid van donar resultats molt semblants. La diferència en la grandària dels pics que es

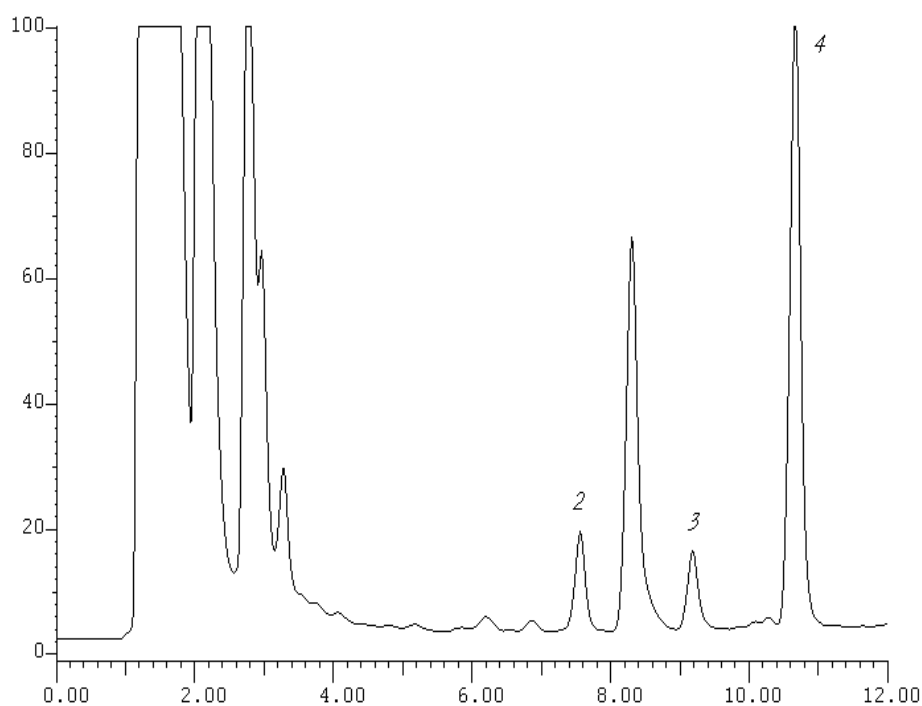


Figure 2.5. Mostra de sang tractada amb perclòric. 1:putrescina, 2:spermidina, 3:spermina i 4: 1,7-diaminoheptà (estàndard intern)

pot apreciar a les **Figures 2.3 i 2.5** ve determinada pel factor de dilució introduït al tractament en medi àcid, en afegir primer el HClO<sub>4</sub> i després el KOH. Els resultats són de l'ordre dels valors trobats a la literatura. Es va escollir el tractament amb calor per les raons esmentades d'estalvi de temps i de manipulació de mostra, i perquè amb el tractament àcid disminuïa la sensibilitat del mètode (pics més petits per una mateixa concentració de PA a la mostra).

#### PROTOCOL

La primera etapa en el protocol de tractament de cèl.lules era el rentat en condicions suaus per evitar el seu trencament. Les cèl.lules, que proliferaven adherides al substrat sòlid, es resuspenien en una solució de tripsina al 0,25% per incubació a 37°C, 5-15 min. La suspensió resultant es diluïa amb un volum igual de medi de cultiu contenint un 10% de sèrum fetal boví per inactivar la tripsina, i es centrifugava suaument (800 × g, 5 min). El sobrenedant es descartava i les cèl.lules es rentaven amb solució de tampó de fosfats salí per resuspensió i centrifugació. Després de rentar-les, es resuspenien en 200 µL d'aigua. El contingut intracel.lular s'alliberava congelant i descongelant la mostra amb nitrogen líquid i un bany d'aigua a 37°C. Aquest mètode es va escollir perquè a diferència del trencament en medi hipotònic no introduïa cap factor de dilució a la mostra. Per precipitar el contingut en proteïnes de les cèl.lules s'afegia àcid perclòric a les mostres, i es refredaven durant 1 hora a 0°C. Els sobrenedants es neutralitzaven amb hidròxid potàssic i es prenia una alíquota per derivatitzar.

#### OPTIMITZACIÓ

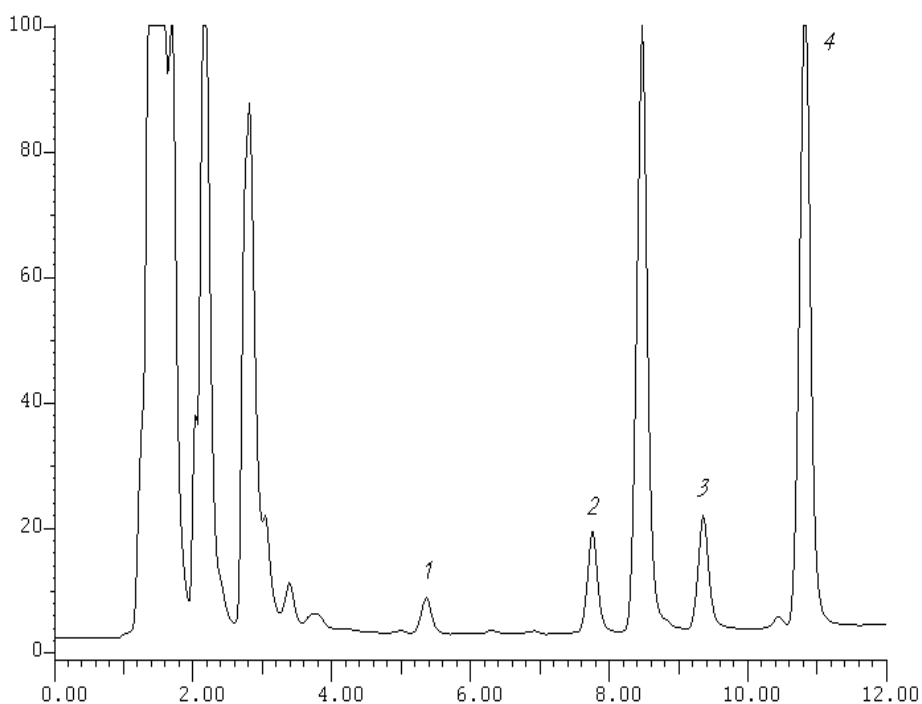
Els cultius de cèl.lules CT-26 i Caco-2 es van resuspendre amb una solució de tripsina 0,25% en PBS. A continuació les cèl.lules es van rentar amb PBS. Aquest rentat és de vital importància en qualsevol experiment a causa de la presència en el sèrum del medi de cultiu de PA i d'enzims que les degraden, principalment oxidases, que poden introduir errors en les mesures. Per adequar la grandària de la mostra al procediment de derivatització i a la corba de calibratge del cromatògraf, el concentrat de cèl.lules resultant de l'últim rentat es va redissoldre en un volum final de 200 µL d'aigua desionitzada. El trencament de les cèl.lules es va fer congelant i descongelant, tal i com es feia amb els eritròcits. El mètode resultava igualment efectiu quan es feia tres vegades. Per trobar un mètode adient d'extracció de proteïnes per cultius de cèl.lules es van estudiar els tractaments per calor i per precipitació amb HClO<sub>4</sub>. Com en el cas de mostres de sang, es van fer una sèrie de proves quantitatives.

(1) *Desproteïmització per calor.* Consistia en escalfar la mostra en un bany d'aigua a 100°C durant 3 min en tubs de polipropilè tancats hermèticament.

(2) *Desproteïmització per precipitació àcida.* Les cèl.lules dissoltes en 200 µL d'aigua es van barrejar amb un volum idèntic de PCA 3M, es van homogenitzar i es van deixar a 0°C durant 1 h amb agitació constant. Els sobrenedants resultants de centrifugar a 5.000 × g durant 5 min es van neutralitzar per addició de 300 µL d'una solució 1,5 M en KOH i incubació a 0°C, 1 h. El precipitat de KClO<sub>4</sub> es va retirar centrifugant de nou a 5.000 × g durant 5 min. Aquest procediment representava diluir la mostra més de 1:3 respecte al procediment de desproteïmització per calor.



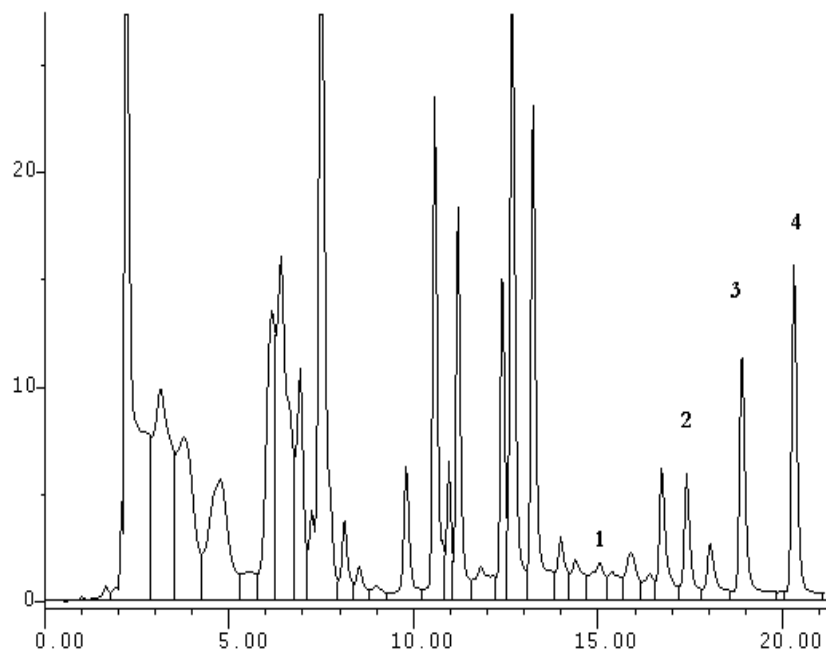
El tractament per calor aplicat als cultius de cèl.lules aconseguia alliberar un percentatge molt petit del contingut en PA observat en l'extracció amb perclòric. Aquesta diferència en els resultats obtinguts en eritròcits i en cultius de cèl.lules podria explicar-se per una distribució de les PA en compartiments intracel.lulars diferents. Un tret característic dels eritròcits, a tenir en compte, és l'absència de nucli, ribosomes i reticle endoplasmàtic, tots tres reservoris importants d'espermidina i espermina en les cèl.lules nucleades. En qualsevol cas, les concentracions de PA obtingudes amb el tractament àcid van ser de l'ordre de les trobades a la literatura i es va decidir aplicar aquest tractament per a l'extracció de proteïnes en cultius de cèl.lules (**Figura 2.7**).



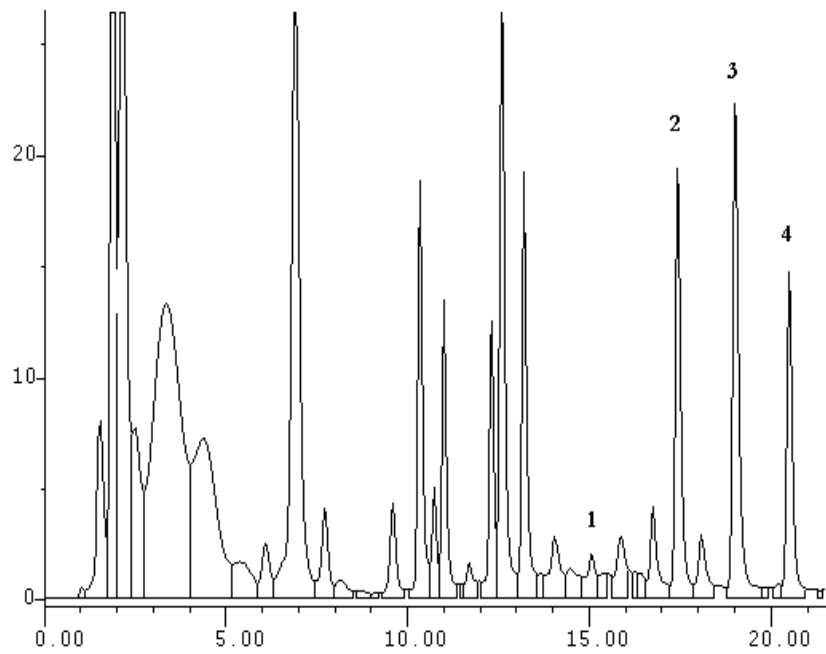
**Figura 2.7.** Mostra de cèl.lules Caco-2 tractada amb perclòric. 1:putrescina, 2:espermidina, 3:espermina i 4: 1,7-diaminoheptà (estàndard intern)

#### 2.2.1.1.3 *Tractament de la mucosa intestinal humana*

Per determinar les concentracions de PA en la mucosa intestinal humana el polvoritzat de mucosa en fred es resuspensia en 250  $\mu$ L de tampó, es sonicava i centrifugava a  $20.000 \times g$ . Per a l'extracció de proteïnes s'utilitzava el mètode seleccionat en el cas dels cultius cel.lulars: 200  $\mu$ L de sobrenedant es barrejaven amb un volum idèntic de PCA 3 M, s'homogeneïtzaven i es refredaven a 0 °C. Posteriorment, els sobrenedants resultants de centrifugar a  $5.000 \times g$  durant 5 min es neutralitzaven per addició d'una solució de KOH 1,5 M. El precipitat de  $KClO_4$  es retirava, centrifugant de nou a  $5.000 \times g$ , 5 min. Una alíquota del sobrenedant es derivatitzava i la resta es conservava a  $-20^{\circ}C$ . A les **Figures 2.8** i **2.9** podeu observar els cromatogrames obtinguts en analitzar mostres aparellades de mucosa sana i tumoral en un mateix pacient de càncer colorectal amb aquest tractament.



**Figura 2.8. Mostra de mucosa de còlon humà. 1: putrescina, 2: espermidina, 3: espermina i 4: 1,7-diaminoheptà (estàndard intern)**

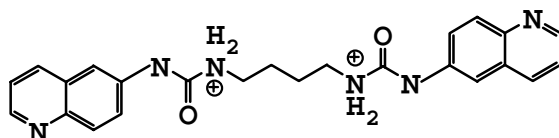


**Figura 2.9. Mostra d'adenocarcinoma de còlon humà. 1: putrescina, 2: espermidina, 3: espermina i 4: 1,7-diaminoheptà (estàndard intern)**

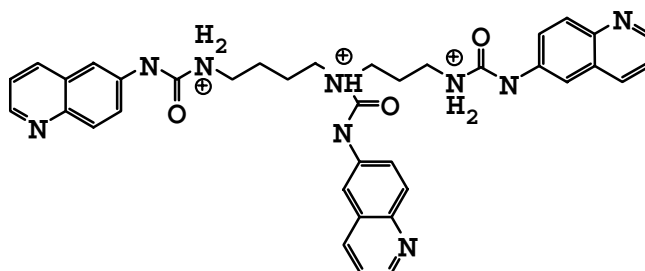
## 2.2.1.2 Derivatització

### 2.2.1.2.1 Fonament

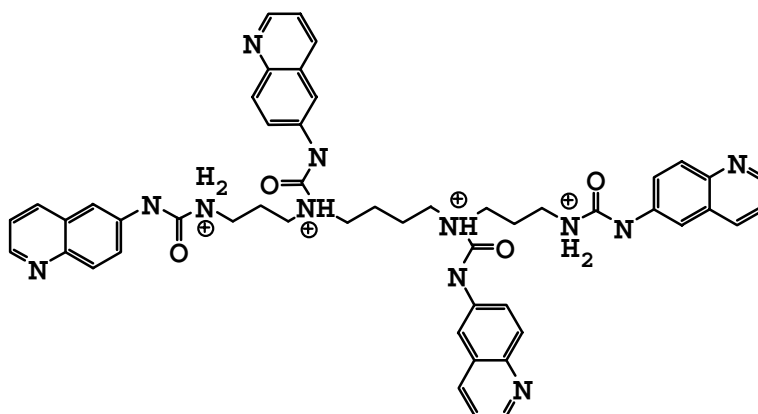
La reacció entre les PA i el QCHS té lloc de forma instantània a temperatura ambient. A cadascun dels grups amino primaris i secundaris de la PA s'incorpora una molècula de quinolinilaminocarbonil (QAC) que queda unida per un enllaç de tipus urea. Els compostos resultants tenen les següents estructures:



**Figura 2.10**  $N^1, N^4$ -Bis(6-quinolinilaminocarbonil)putrescina.



**Figura 2.11**  $N^1, N^4, N^8$ -Tris(6-quinolinilaminocarbonil)espermidina.



**Figura 2.12**  $N^1, N^4, N^9, N^{12}$ -Tetrakis(6-quinolinilaminocarbonil)espermina.

El reactiu QCHS es comercialitza com un sòlid liofilitzat altament higroscòpic. Per dilució en 1 mL d'acetonitril de grau fluorimètric obteniem una solució de treball 10 mM. Un cop dissolt el producte es mantenia en atmosfera d'argó, ja que en poques hores s'hidrolitzava i esdevenia inservible. L'atmosfera inert no evitava completament la degradació del producte, i com es volia optimitzar un mètode de caràcter quantitatiu, es va decidir treballar amb reactiu de nova preparació en tots els casos. D'aquesta forma, en menys de 30 min es consumia una unitat d'AQC (nom comercial del QCHS) per derivatitzar 50 mostres. La cinètica de la reacció, i l'estabilitat dels derivats formats permetien procedir al seu anàlisi cromatogràfic de forma immediata.

#### 2.2.1.2.2 Optimització de les condicions de derivatització

Els estudis realitzats per Cohen i Michaud (1993), i Merali i Clarkson (1996) sobre la reacció del QCHS amb aminoàcids indicaven la necessitat de disposar d'una relació QCHS:grups amino reactius de 4:1 per a obtenir un rendiment màxim. Aquesta relació es vàlida només en condicions òptimes ja que la presència de molècules susceptibles de reaccionar amb el QCHS a les mostres biològiques fa necessari augmentar-la de forma dramàtica. En aquest sentit, no hi ha problema, i sempre segons Cohen, les propietats fluorescents dels productes de la hidròlisi del reactiu permeten arribar a una relació 10.000:1 sense cap interferència en la quantificació. Per altra banda, Weiss *et al.* (1997) feien servir una relació 400:1 en el seus estudis d'aplicació del mètode a la detecció de PA.

Els tractaments de mostra aplicats a mostres de eritròcit i cèl.lules només deixaven com a potencials interferents de la reacció entre el QCHS i les PA els aminoàcids lliures, les amines i els pèptids. Les concentracions dels primers podien arribar a desenes de micromols per litre a la mostra tractada. Per això, es va determinar com afectava l'addició d'una solució estàndar de 16 aminoàcids 80 µM en la determinació quantitativa de les tres PA. Les concentracions de PA estudiades van ser 5 µM. Dues sèries de cinc derivatitzacions es van cromatografiar en dos experiments diferents amb un grup control de derivatitzacions en absència d'aminoàcids.

**Taula 2.8 Paràmetre de quantificació cromatogràfic de les poliamines en absència i en presència d'una barreja d'aminoàcids 80µM**

	$A_{pic}/A_{e. i.} \times 10^2$ (n=10)	
	Controls	Aminoàcids
Putrescina	42,71 ± 3,46	39,46 ± 4,01
Espermidina	15,27 ± 0,29	14,88 ± 1,42
Espermina	15,36 ± 0,72	16,56 ± 1,24

No es van trobar diferències estadísticament significatives en la quantificació dels pics en presència d'aminoàcids respecte als valors trobats en el grup control. En aquest últim, només eren presents les PA i l'estàndar intern, i la relació QCHS:grups amino va ser aproximadament 360:1. En canvi, en presència dels aminoàcids aquesta relació va disminuir fins a 20:1. Aleshores, es va decidir utilitzar la primera relació per fer les proves de validació

del mètode i per la derivatització de mostres: per un volum de mostra de 10 µL, es van fer servir 20 µL de QCHS 10 mM. Per equilibrar el pH de la barreja de reacció es va utilitzar un tampó de tetraborat sòdic 0,2 M de pH 8,8.

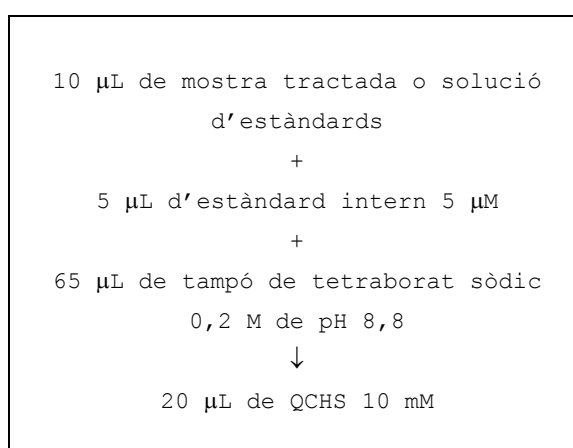
La proporció de volums reactiu:tampó borat recomanada en el cas de treballar amb aminoàcids és igual o inferior a 4:1 (Cohen i Michaud 1993). Com era previsible utilitzar quantitats de tampó més altes per neutralitzar tractaments de mostra àcids, es va investigar l'efecte d'afegir una relació tampó:reactiu de 5,5:1 i 8:1 front a una relació inferior a 4:1 a una mateixa mostra de cèl.lules Caco-2.

**Taula 2.9 Paràmetre de quantificació cromatogràfic de les poliamines en funció de la relació volumètrica tampó borat vs. reactiu.**

V <sub>tampó</sub> :V <sub>reactiu</sub>	A <sub>pic</sub> /A <sub>e. i.</sub> × 10 <sup>2</sup> (n = 3)		
	3,25 : 1	5,5 : 1	8 : 1
Putrescina	6,27 ± 1,13	5,96 ± 0,01	6,04 ± 0,62
Espermidina	15,70 ± 1,29	15,27 ± 0,77	16,30 ± 0,76
Espermina	17,91 ± 0,81	13,08 ± 0,20*	13,58 ± 0,45*

\* Diferències significatives amb p < 0,05

Mentre que les mesures de putrescina i espermidina no es veien alterades per la presència creixent de borat, en el cas de l'espermidina es va observar un descens estadísticament significatiu en la formació de derivat. La relació 3,25:1 es va fer servir en tots els experiments següents. L'esquema de derivatització va quedar establert tal i com es veu a la **Figura 2.13**. Aquest esquema permetia fer triplicats per a cada mostra derivatitzada, considerant una grandària de bucle d'injecció de 30 µL de capacitat. En optimitzar el mètode d'injecció de mostres cada punxada va requerir una alíquota de 80 µL. Per això, el volum final de la barreja es va augmentar mantenint les proporcions esmentades.



**Figura 2.13 Esquema de derivatització.**

### 2.2.1.2.3 Proves d'estabilitat dels derivats QAC

L'estabilitat dels derivats formats pel QCHS va ser un motiu clau per escollir aquest reactiu. L'absència d'un sistema automàtic d'injecció de mostra en el cromatògraf implicava treballar de forma discontinua i, per això, era necessària una reproduïbilitat molt acurada. Deixant de banda els errors introduïts per operacions tècniques (tractament de mostra, derivatització, injecció de mostra) o les limitacions del sistema, la reproduïbilitat es veia afectada bàsicament per la pèrdua de senyal fluorescent de les mostres.

Es van trobar dos estudis d'estabilitat dels derivats QAC-PA en la bibliografia. Merali i Clarkson (1996), per comprovar l'estabilitat d'aquests productes, van cromatografiar mostres conservades a temperatura ambient durant els tres dies posteriors a la derivatització, i obtenien àrees de pic iguals o superiors al  $95 \pm 2\%$  de l'àrea obtinguda de forma immediata a la reacció. Al segon estudi (Weiss *et al.* 1997), es cromatografiava una solució d'estàndards derivatitzats i conservats a temperatura ambient fent deu punxades durant 1 mes. El coeficient de variació en les mesures quantitatives arribava, en el pitjor dels casos, a 7,5%. Cap dels dos estudis donava explicacions més detallades sobre les proves realitzades.

Les condicions cromatogràfiques establertes a l'inici del procés d'estandarització ens permetien fer un cromatograma cada 50 min. Un treball de 8 hores diàries permetia analitzar 60 alíquotes de mostra injectades setmanalment, si no es tenia en compte una primera punxada diària d'acondicionament del sistema. Es va estudiar llavors quina reproduïbilitat presentaven les mesures de diferents solucions d'estàndards de les tres PA, i l'estàndard intern durant un període d'un mes. Les mostres es van conservar a 4°C. Alíquotes de cada mostra ( $n = 10$ ) es van cromatografiar per quadruplicat un cop per setmana.

**Taula 2.10 Reproduïbilitat en la quantificació de 10 solucions d'estàndards analitzades durant un mes**

	CV%
Putrescina	9,97
Espermidina	8,16
Espermina	9,82
Estàndard intern	6,10

A la **Taula 2.10** podeu veure els coeficients de variació totals en la quantificació de cada poliamina durant un mes. Els resultats obtinguts, malgrat ser molt bons, no eren vàlids per estandaritzar el mètode. Es va repetir l'experiment reduint el període d'estudi a dues setmanes, temps més que suficient pels nostres propòsits (**Taula 2.11**).

**Taula 2.11 Reproduïbilitat en la quantificació de 5 solucions d'estàndards analitzades durant 2 setmanes**

	CV%
Putrescina	5,20
Espermidina	4,17
Espermina	6,07
Estàndard intern	3,54

### 2.2.1.3 Separació cromatogràfica

#### 2.2.1.3.1 Fonament

Per separar les PA, les mostres s'injectaven en una columna cromatogràfica  $C_{18}$  de fase inversa. En aquest tipus de columnes la fase estacionària està formada per cadenes *n*-octadecil paral·leles, unides a un suport de sílice amb una estructura de tipus raspall. Aquest recobriment enllaçat es concep com un líquid convencional retingut físicament. Per altra banda, el concepte de fase inversa distingeix la polaritat relativa de les fases que s'empren: la fase estacionària és apolar (sovint un hidrocarbur) i la fase mòbil és relativament polar (aigua, metanol o acetonitril). Els derivats de les PA i altres constituents de la mostra interaccionen amb els grups octadecil per les parts hidròfobes de la seva estructura, com els carbonis aromàtics dels grups QAC o els grups propil i butil de les PA. Les molècules de la fase mòbil, aigua i acetonitril, són molt polars i no queden retingudes.

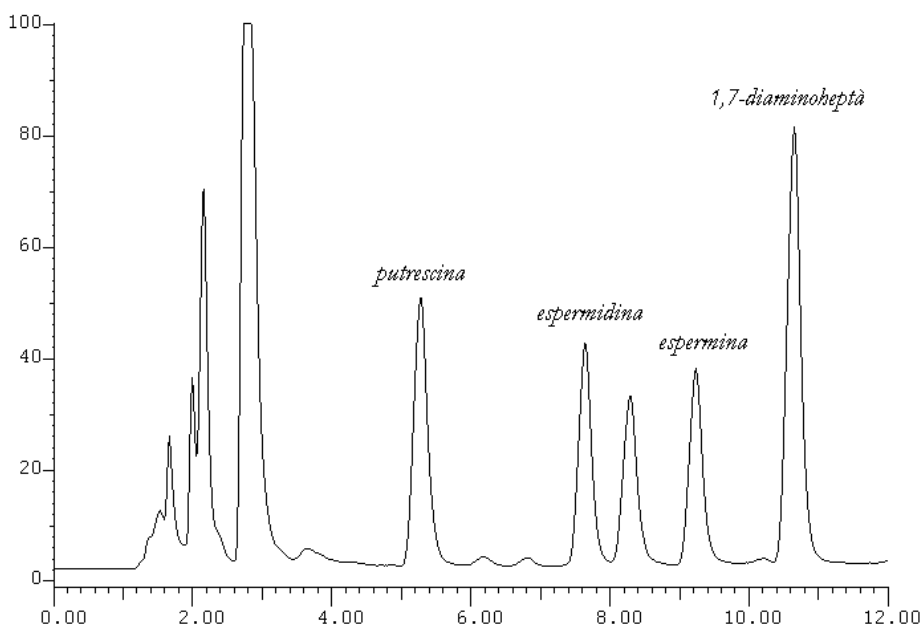


Figura 2.14. Barreja d'estàndards de poliamines 15 microM

S'estableix llavors un equilibri de repartiment de les PA entre les dues fases. L'equilibri és un procés dinàmic que permet que els soluts migrin físicament per la columna de forma diferencial en funció del valor de la seva constant d'equilibri. Per aconseguir una elució de la columna més ràpida es fa servir un procediment d'elució en gradient. Inicialment, la mostra arriba a la columna arrossegada per una fase mòbil que és 80% fase aquosa i 20% acetonitril. El percentatge d'acetonitril a la fase mòbil augmenta gradualment, disminuint la seva polaritat i augmentant la seva afinitat per les PA. L'equilibri de repartiment es

desplaça contínuament a la dreta i les molècules migren cada cop més ràpidament. Quan la fase mòbil conté un 40-55% d'acetonitril, les PA surten de la columna cap al detector en l'ordre que es pot veure a la **Figura 2.14**. Aquest ordre no només depèn de la quantitat de superfície apolar de la molècula sinó també de factors estèrics. Les molècules d'espermina i d'espermidina tenen més parts apolars que la de diaminoheptà, però en canvi, tenen grups amino entre les cadenes hidrocarbonades que afavoreixen conformacions poc favorables per a la interacció amb la fase sòlida. Això explica el fet que elueixin abans que l'estàndard intern.

#### 2.2.1.3.2 *Equip instrumental*

Per separar les PA es va fer servir un equip de cromatografia que a part del detector i l'ordinador constava de quatre components essencials: un sistema de desgasificació de líquids, una bomba de líquids d'alta pressió, un sistema d'injecció manual de mostres i una columna cromatogràfica. A continuació es comenten breument els solvents cromatogràfics emprats i es descriu els altres components de l'equip.

#### SOLVENTS CROMATOGRÀFICS

Els solvents emprats van ser tres: un tampó d'acetat-trietilamina a pH 5,05, acetonitril pur i aigua desionitzada. El tampó es preparava al laboratori aproximadament un cop al mes. Per preparar 5 L de tampó el protocol era el següent: es pesaven 95,26 grams d'acetat sòdic i es dissolien en aigua desionitzada amb agitació constant. S'afegia 11,26 mL de trietilamina mitjançant una pipeta graduada de vidre en una campana extractora de fums. Una vegada homogeneïtzat el tampó el seu pH es desplaçava des de 11,4 fins al pH de treball (5,05) per valoració amb una solució d'àcid fosfòric al 50%. Finalment el tampó es filtrava a través d'una membrana de 0,45 µm i es conservava a 4°C. L'estabilitat del tampó a 4°C era relativament bona: passat un mes, el pH s'alcalinitzava lleugerament fins 5,15-5,19. De totes formes aquesta variació no era acceptable, perquè afectava a la ionicitat de la fase mòbil, i en conseqüència a la capacitat de retenció de la fase estacionària (temps de retenció variables). La raó d'aquest canvi és el creixement espontani de microorganismes (algues i bacteris) en els tampons aquosos. Per evitar-ho s'afegien unes gotes d'azida sòdica al 10% a la solució acabada de valorar. D'aquesta forma, el pH del tampó no canvia en més de ± 0,01 en un període de dos mesos. Mentre que l'àcid fosfòric i l'acetat són modificadors del pH del tampó, la trietilamina és un additiu afegit a la fase mòbil per modificar la selectivitat de la columna i prevenir l'asimetria dels pics. És un agent emmascarador dels grups silanol del suport de sílice que no han estat substituïts per cadenes octadecil en la fabricació de les columnes C<sub>18</sub>. S'uneix a ells per ponts d'hidrogen, i d'aquesta forma redueix fenòmens inespecífics d'adsorció i/o d'intercanvi iònic amb les PA. L'acetonitril que es fa servir és de grau Fluorescència, i es filtrava a través d'una membrana de 0,45 µm per eliminar pols i possibles partícules sòlides abans dipositar-ho en el seu reservori corresponent al sistema d'HPLC. L'aigua, utilitzada per rentar el sistema de sals i substàncies polars després de cada mostra cromatografiada, es filtrava i desionitzava diàriament amb un sistema MilliQ de Waters.



## SISTEMA D'HELI PER LA DESGASIFICACIÓ DE SOLVENTS

Un aspecte crític en el treball amb cromatografia líquida d'alta pressió és la puresa i netedat dels líquids que entren en el sistema. L'absència de gasos en tampons aquosos, fases orgàniques i aigua és particularment desitjable. L'acumulació de bombolles d'aire dintre de la bomba pot provocar cavitacions en els pistons amb conseqüències fatals. De la mateixa manera, el rebliment de la columna pot oxidar-se parcialment per la presència constant de petites quantitats d'oxigen a la fase mòbil. Això comporta una pèrdua de resolució en la separació dels pics cromatogràfics. Treballar amb líquids no desgasificats correctament també porta associats altres problemes menys importants però que impedeixen treballar amb un rendiment òptim: el descebament de la bomba amb la conseqüent necessitat de purgar bé el sistema és el més freqüent. Per altra banda, la presència de bombolles d'aire en l'eluent que surt de la columna modifica de forma notable el senyal fluorescent. Quan la seva concentració és gran, produeix un característic patró de micropics ficticis a intervals regulars en els cromatogrames. A concentracions imperceptibles, l'oxigen dissolt pot reduir la intensitat de fluorescència de la mostra per dues causes: per atenuació ([angl.] *quenching*) degut a les propietats paramagnètiques de l'oxigen molecular, i per oxidació fotoquímica de les espècies fluorescents. En ambdós casos la presència d'aire pot implicar la pèrdua de mostres. Tres raons van fer aconsellable acoblar un sistema d'heli a l'equip cromatogràfic. La bomba de líquids Kontron 525 es descebava amb relativa facilitat si l'aparell havia estat parat unes 12 hores. El mode de treball discontinu comportava fer servir els mateixos solvents varis dies. I per últim, l'augment de la temperatura durant l'estiu afavoria considerablement la formació de gasos als líquid. El sistema de desgasificació utilitzat consistia en un bombona d'heli comprimit N55, un manoreductor per controlar el cabdal de gas, una instal·lació de tub de coure, tub de tefló per introduir el gas en els reservoris dels solvents, i uns difusors porosos per dispersar l'heli de forma homogènia. Posteriorment es van introduir unes vàlvules antiretorn per evitar l'efecte sifó observat en tancar el corrent de gas. Com a procediment alternatiu al sistema d'heli es feia servir inicialment la filtració dels líquids per membranes amb porus de 0,45  $\mu\text{m}$ . Però aquesta operació era necessari fer-la diàriament i consumia temps, per això es va substituir per l'heli, i es va emprar només per eliminar partícules sòlides en els solvents de nova preparació.

### BOMBA DE LÍQUIDS D'ALTA PRESSIÓ

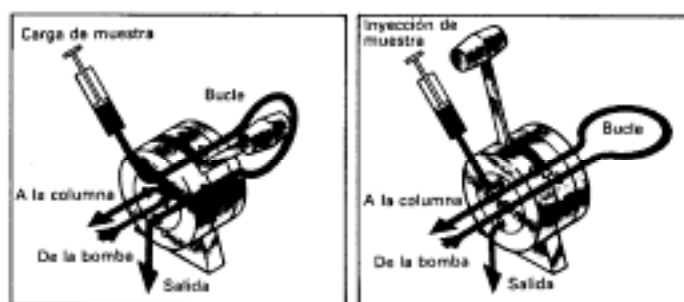
La bomba cromatogràfica és el dispositiu que proporciona a la fase mòbil la pressió necessària per tal que, operant al flux i velocitat precises, travessi la columna. Aquesta definició posa de manifest la característica més important d'aquest aparell: moure la fase mòbil a un flux constant (modificant la pressió) o a una pressió constant (modifiquen el flux per a assolir-la). La bomba que vam utilitzar en els nostres experiments era una bomba de pistó de flux constant. En aquest tipus de bomba, un dispositiu elèctric actua sobre un pistó que en entrar en una cambra on es troba l'eluent, el comprimeix i l'empeny cap a dintre del sistema. Dues vàlvules amb tancament de bola, que s'obren i tanquen alternativament, controlen el flux del solvent cap a dintre i fora de la cambra. Aquest sistema permet moltes embolades per unitat de temps (fins a 100 per minut), i allibera

doncs un flux quasi constant, que depèn de la relació entre el volum de la cavitat on s'allotja el pistó i la longitud d'aquest. L'acció d'un pistó únic té l'inconvenient de provocar variacions a la línia de base per cada embolada, produint un flux que oscil·la de forma cíclica amb el temps. Per això, la fase mòbil es mou amb un sistema de pistó recíproc; dos pistons que treballen desfasats mig període produeixen un flux que és la combinació del flux generat per cada pistó i per tant és més estable. Tot i el fet de treballar amb detectors molt sensibles, el soroll de fons de la línia de base als cromatogrames, produït per petites variacions en el flux encara és un problema, i és necessària la presència d'un atenuador d'impulsos darrera del sistema de pistons. Aquest treballa absorbint les fluctuacions de la pressió mitjançant un diafragma especial inclòs dintre d'un mòdul pressuritzat. Altre component indispensable de la bomba és un dispositiu electrònic de control de la pressió del sistema que permet seleccionar un màxim i un mínim de pressió de treball. Fora d'aquests límits la bomba s'atura de forma automàtica. Les raons que el fan necessari són dues: (a) evitar que una obstrucció a qualsevol component de l'equip ocasioni una sobrepressió i exploti alguna part delicada del cromatògraf (límit superior), i (b) impedir l'entrada d'aire al sistema (límit inferior). Aquesta darrera es caracteritza per una caiguda ràpida de la pressió motivada pel tancament incorrecte d'una de les vàlvules. Per treballar amb elució en gradient el sistema disposa d'una cambra de barreja de solvents a baixa pressió situada davant de la bomba pròpiament dita. La cambra treballa mitjançant un sistema de vàlvules que s'obren i es tanquen controlades per un solenoide (part electrònica). Es barreja la fase aquosa i l'acetoni-tril en funció d'un gradient prèviament programat. La barreja es fa a pressió atmosfèrica, i després la fase mòbil es comprimeix fins a 100-200 bar, pressió de treball necessària per a mantenir un flux constant de 1 mL/min.

#### SISTEMA D'INJECCIÓ DE MOSTRES

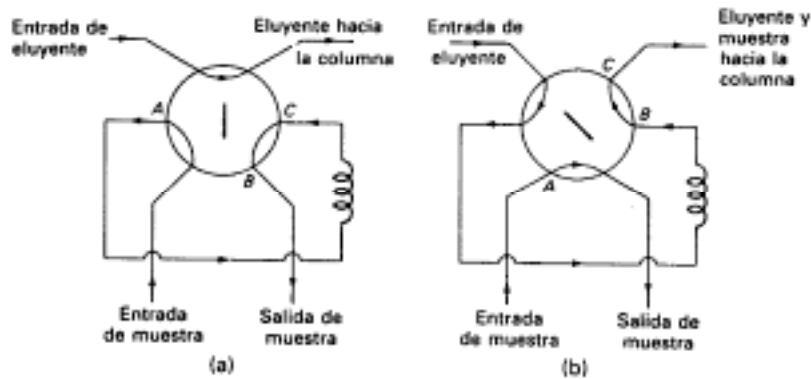
El sistema cromatogràfic es sotmet a una pressió per vèncer la resistència de la columna a la passa de fase mòbil obtenir un flux desitjat. Per això, totes les parts entre la bomba i la columna es troben tancades a l'atmosfera exterior. La posició de l'injector anteposat a la columna implica que la introducció de mostra es faci mitjançant un sistema, generalment de vàlvules, que pot incorporar la mostra a la fase mòbil sense pèrdues de pressió que alterin el flux.

En la nostra feina, el sistema emprat era un sistema de vàlvules amb una disposició en forma de bucle ([angl.] *loop*) (**Figura 2.16**) dissenyat per conservar la pressió de la bomba



**Figura 2.15** Bucle de mostra per líquids (a Skoog DA i Leary JJ. Anàlisi instrumental. 4<sup>a</sup> ed. MacGraw-Hill, Madrid, 1993).

durant la introducció de les mostres en el sistema. El seu fonament és senzill, consta de sis fases de flux o vàlvules, que en posició de càrrega de mostra queden tal com es veu a l'esquerra de la **Figura 2.17**:



**Figura 2.16** Diagrama de flux de l'injector en les posicions de càrrega (a) i d'injecció (b) de mostra. (a Skoog DA i Leary JJ. Análisis instrumental. 4<sup>a</sup> ed. MacGraw-Hill, Madrid, 1993).

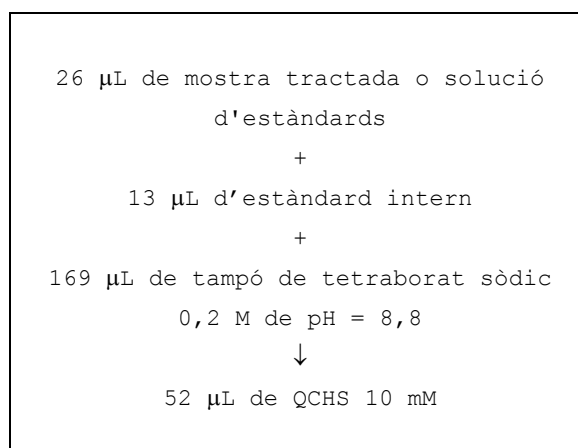
La introducció de la mostra es fa amb una microxeringa de baixa pressió a través d'una porta al rotor de l'injector. Aquesta és paral·lela a l'eix de l'aparell i desemboca en un bucle on queda dipositada la mostra gràcies a un segell de tefló. En la posició de càrrega (a) la mostra entra i omple el bucle per la vàlvula A. La introducció d'un excés de mostra és tolerada perquè la sortida del bucle queda connectada amb un tub de rebrec que condueix l'excés a l'exterior (sistema CB). Dintre del sistema queda un volum de mostra problema equivalent al volum intern del bucle. La fase mòbil bombejada troba un camí de retorn a la vàlvula immediata, dirigint-se a la columna sense travessar el bucle. En girar el rotor a la posició d'injecció (b), la fase mòbil inicia el bucle que ha estat omplert de mostra. Travessa el bucle i arriba a la vàlvula B comunicada ara amb C, per on entra a la columna. Per carregar la mostra a l'injector es poden utilitzar dos mètodes. Omplir completament el bucle o fer-ho parcialment. El primer és el mètode convencional i implica treballar amb un excés de mostra. El segon, indicat quan la grandària de la mostra és limitada, consisteix en desplaçar el solvent que hi queda al bucle amb un 50% en volum de mostra. En el primer cas, l'excés és necessari perquè la velocitat del fluid al tub del bucle varia d'un màxim a l'eix del tub a zero a les parets. A mida que la mostra empeny fora el solvent durant la càrrega, la interfase mostra solvent es va fent difusa. El solvent resta a les parets. La quantitat de mostra al bucle s'aproxima al seu màxim de forma asimptomàtica. Dos o tres vegades el volum del bucle es requereixen per a assolir un 95% del màxim. És el mínim recomanat per una bona precisió, però de cinc a deu vegades aquest volum encara la milloren.

Per comprovar si el guany en precisió compensava el reactiu consumit es va determinar experimentalment com afectava un increment en el volum de mostra injectat al coeficient de variació de les dades analítiques. Es van provar volums 2,3, 4 i 5 × la grandària nominal d'un bucle de 20  $\mu\text{L}$  amb diferents solucions estàndards 5  $\mu\text{M}$  de les PA per injecció repetida d'alíquotes d'una mateixa solució.

**Taula 2.12 Efecte del tamany de mostra injectada sobre la precisió de les mesures**

$V_{\text{mostra}} : V_{\text{bucle}}$	CV %				
	$1 \times (n=5)$	$2 \times (n=6)$	$3 \times (n=6)$	$4 \times (n=6)$	$5 \times (n=6)$
Putrescina	6,00	3,05	2,76	2,63	1,07
Espermidina	5,20	2,77	1,43	1,94	1,93
Espermina	11,60	8,81	7,56	4,70	5,01

Es va decidir utilitzar la relació  $4 \times$  perquè la precisió en les mesures d'espermina, la més gran de les tres de forma destacada, no millorava més. L'esquema de derivatització per a obtenir triplicats d'una alíquota de mostra derivatitzada mitjançant un excés  $4 \times$  i un bucle de  $20 \mu\text{L}$  es mostra a la **Figura 2.18**.



**Figura 2.17** Esquema de derivatització.

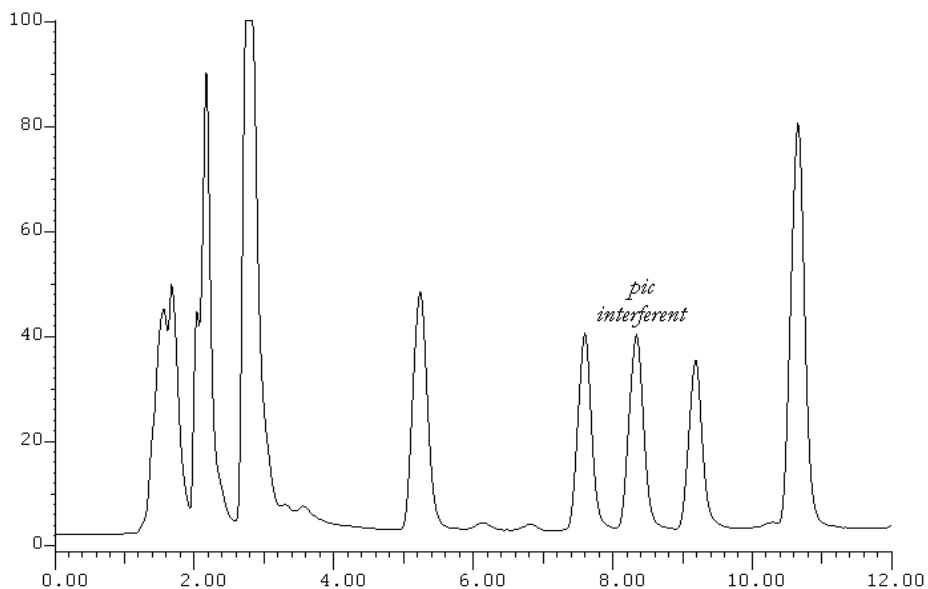
### 2.2.1.3.3 Identificació dels pics cromatogràfics

La identificació dels pics cromatogràfics corresponents a cadascuna de les PA i a l'estàndard intern es va realitzar mitjançant els seus temps de retenció. Per això, es van cromatografiar solucions estàndard de cada PA, i després barreges estàndard de totes elles. Els temps característics es poden observar a la **Taula 2.13**.

**Taula 2.13 Mesures de dispersió en el temps de retenció en 20 determinacions d'una barreja d'estàndards de PA i l'estàndard intern  $5 \mu\text{M}$**

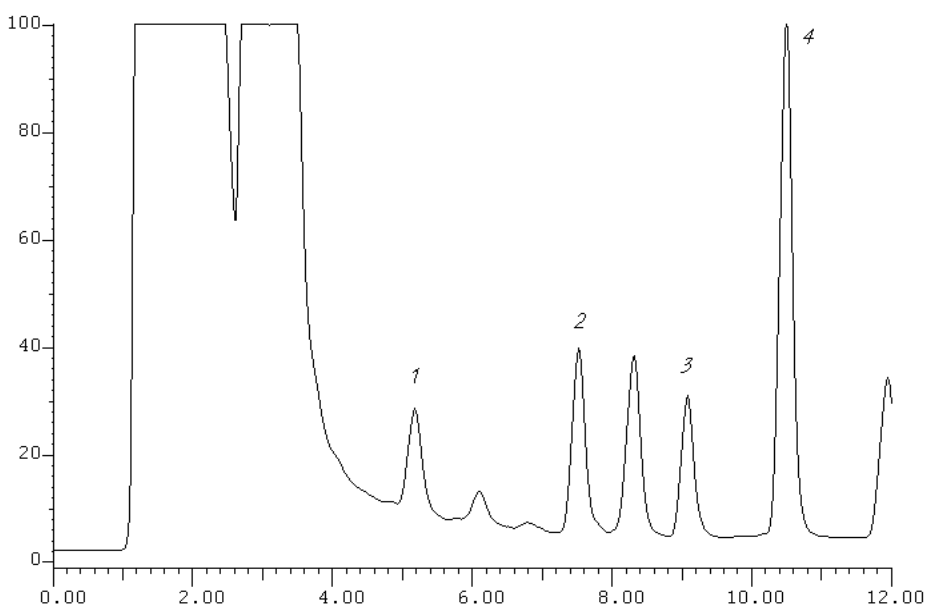
	Mitjana (min)	Desviació típica	CV (%)
Putrescina	5,19	0,19	3,57
Espermidina	7,54	0,12	1,60
Espermina	9,23	0,14	1,53
Estàndard intern	10,53	0,12	1,17

A la **Figura 2.19** s'observa que les PA i l'estàndard intern eluïen totes en un període de 5 minuts, conjuntament amb una molècula, producte secundari de la reacció de derivatització (pic interferent). La putrescina va mostrar un CV amb un valor doble que la resta, atribuïble a la seva proximitat al front del solvent.



**Figura 2.19.** Barreja d'estàndards de poliamines 15 microM

La confirmació de la identitat dels pics en les mostres es va realitzar de forma qualitativa addicionant volums coneguts d'estàndards de PA i comparant els temps de retenció dels pics en les mostres sense (**Figura 2.20**) i amb (**Figura 2.21**) addició.



**Figura 2.20.** Mostra de cèl·lules Caco-2 sense addició d'estàndards. 1: putrescina, 2: espermidina, 3: espermina i 4: 1,7-diaminoheptà (estàndard intern).

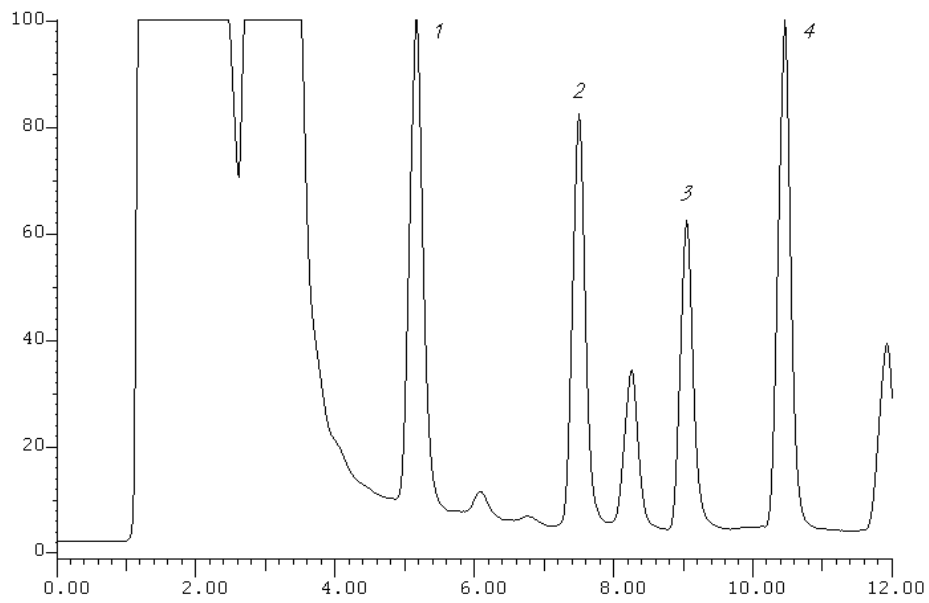


Figura 2.21. Mostra de cèl·lules Caco-2 amb addició d'estàndards. 1: putrescina, 2: espermidina, 3: espermina i 4: 1,7-diaminoheptà (estàndard intern).

#### 2.2.1.3.4 Optimització de la separació

Una separació cromatogràfica s'optimitza variant les condicions experimentals per tal que els components d'una barreja es separin totalment en el mínim de temps. Puix que optimitzar resolució i temps no és possible per unes mateixes condicions, l'objectiu és sempre una solució de compromís. Per explicar com es va abordar la millora del mètode cal desenvolupar un parell de fórmules matemàtiques. El factor de capacitat,  $k'$ , és un paràmetre important en cromatografia que es fa servir per descriure la velocitat de migració dels analits a la columna:

$$k'(A) = \frac{t_R - t_M}{t_R}$$

on  $t_R$  és el temps de retenció de l'analit A, i  $t_M$  el d'un component que no es reté a la columna i arriba al detector immediatament després del començament de l'elució. Quan  $k' \ll 1$  l'elució és massa ràpida per poder quantificar bé  $t_R$ . Quan el seu valor és de l'ordre de 20 o 30 els temps de retenció són massa llargs. Es consideren condicions òptimes de separació quan els analits a resoldre tenen  $1 < k' < 5$ .

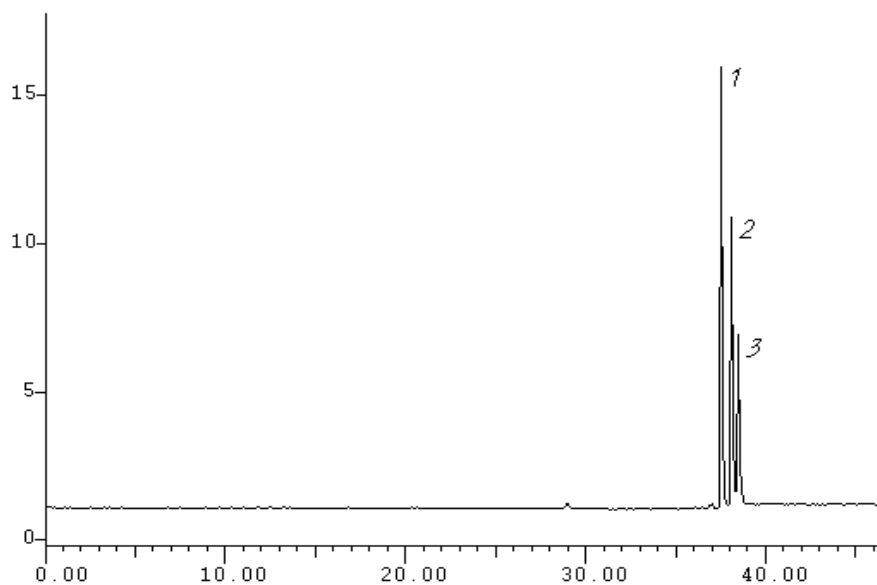
Per escollir quines són aquestes condicions es fa servir una expressió matemàtica de la resolució de la columna  $R_s$ . Per dos analits A i B ( $t_R(A) < t_R(B)$ ) que es volen resoldre:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot (\alpha - 1) \cdot \left( \frac{k'}{1 + k'} \right)$$

on  $N$  és el nombre de plats teòrics de la columna,  $\alpha$  es el factor de selectivitat i  $k'$  es el promig dels factors de capacitat dels dos analits:  $k'(A) + k'(B) / 2$ .

El recurs d'augmentar el paràmetre  $N$  per millorar la separació equival a canviar la columna per una més llarga o amb unes partícules de grandària menor. És una solució costosa que allarga el temps d'anàlisi. Per altra banda, el factor de selectivitat és el quocient  $k'(A) / k'(B)$ . És possible augmentar el seu valor mantenint  $k'$  dintre d'un rang acceptable de 1 a 10. Generalment però, la forma més senzilla de millorar la resolució és optimitzant  $k'$ . Amb fases mòbils líquides canviar la composició del solvent és el procediment escollit, encara que existeixen altres com canviar la temperatura de la columna o el pH del solvent aquós.

La separació de les PA pot aconseguir-se fent servir un únic solvent de composició constant aigua:metanol o aigua:acetonitril (elució isocràtica) (**Figura 2.22**).



**Figura 2.22.** Barreja d'estàndards de PA 5 microM resolta en un gradient isocràtic 10%. 1: putrescina, 2: espermidina i 3: espermina.

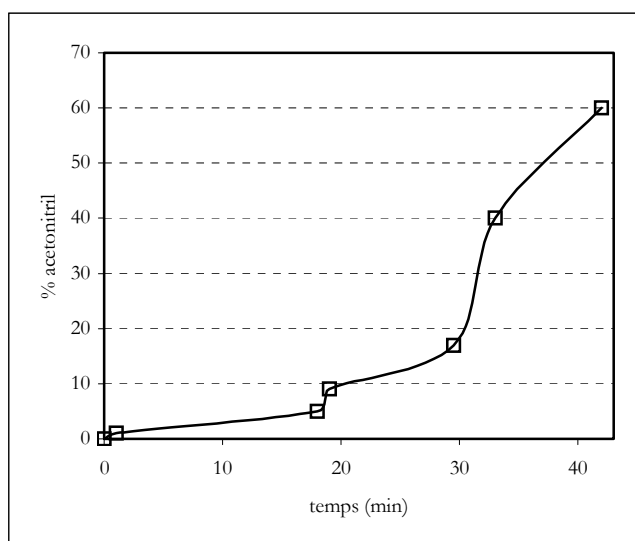
L'eficiència de la separació augmenta notablement amb una elució en gradient, que permet millorar alhora la resolució i els temps de retenció dels pics cromatogràfics. En la primera publicació on va aparèixer un mètode de separació de derivats QAC-PA, es treballava amb el següent gradient d'elució (**Taula 2.14**).

**Taula 2.14** Gradient per la separació de PA en fase inversa (Merali i Clarkson 1996)

Temps (min)	Fase aquosa (%)	Acetonitril (%)	Aigua (%)
0	100	0	0
1	99	1	0
18	95	5	0
19	91	9	0
29,5	83	17	0
33	60	40	0
42	0	60	40
50	100	0	0

El temps d'anàlisi total tenint en compte una duració de la fase final d'equilibrament de columna d'uns 10 min era de 60 min. El significat d'aquest gradient es fa més aparent representant el % d'acetonitril a la fase mòbil en funció del temps (**Figura 2.23**)





**Figura 2.23** Representació del gradient per a la separació de PA en fase inversa com variació del % d'acetonitril a la fase mòbil amb el temps (Merali i Clarkson 1996).

Es tracta d'un gradient de tipus còncau on els canvis entre composicions són lineals i no exponencials com seria el cas òptim. És un gradient molt semblant al que van aplicar Cohen i Michaud (1993) per a la separació de derivats QAC-AA. En aplicar aquest primer gradient esmentat al nostre sistema cromatogràfic es van obtenir resultats semblants als publicats. Als cromatogrames de mostres biològiques presentats per Merali i Clarkson (1996) s'observa que la primera substància que elueix de columna ho fa a  $t = 12,5$  min. Els pics de les PA i l'estàndard intern apareixen agrupats entre 35 i 38 min. Els coeficients de capacitat per a les PA es troben llavors en un rang òptim (1,80-2,04) per aconseguir separar-les. Malgrat això, es van observar dos inconvenients en aquest mètode:

- (a) El temps d'anàlisi era innecessàriament llarg degut a un gradient d'elució inapropiat.
- (b) La presència d'altres molècules a les mostres interferia de forma notable amb la quantificació de les PA i l'estàndard intern.

Un temps d'anàlisi tan extens només podria justificar-se per la necessitat de resoldre les PA d'altres analits de la mostra que no es separen amb gradients més curts. Però aquest no és el cas. Per altra banda, si la intenció era separar només les PA perquè començar un gradient tan suau on el primer pic apareix als 12 minuts?. El gradient emprat per Merali és un gradient apropiat per resoldre aminoàcids, és a dir, uns setze pics cromatogràfics de substàncies molt semblants, però no per a aïllar les PA. Així doncs, vam optimitzar les condicions de separació canviant la composició de la fase mòbil o, el que és el mateix, modificant el gradient d'elució. La recerca d'un gradient apropiat es fa de forma purament empírica, ja que és impossible predir el comportament cromatogràfic de totes les substàncies de la mostra. Es va partir de les premisses següents: (a) qualsevol substància que aparegués al cromatograma abans de les PA (aminoàcids, amines, amoníac, AMQ,...)

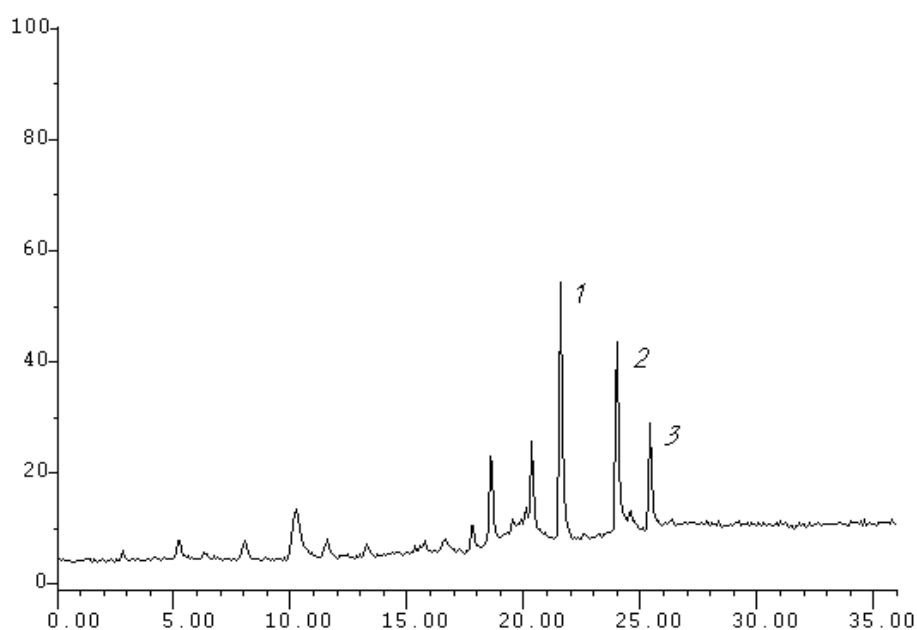
constituïa un interferent potencial en un canvi de gradient mentre que (b) si s'augmentava la composició inicial d'acetonitril a la fase mòbil, o bé s'augmentava el pendent del gradient fins una mica abans de la sortida de la primera poliamina era possible fer sortir aquestes substàncies en forma d'un o varis pics massius no resolts al principi del cromatograma.

Per resoldre interferents que apareixien a la zona d'elució de les PA la única possibilitat era eixamplar al màxim aquesta zona per resoldre tots els pics. El mètode escollit per començar a estudiar gradients va ser el d'avançar el front, és a dir, enlloc de començar l'elució amb una fase mòbil 100% aquosa, començar amb un percentatge d'acetonitril convenient per determinar experimentalment. Per altra banda, es va considerar oportú simplificar radicalment el perfil del gradient, i fer servir un gradient de tipus lineal, o com a molt un gradient compost d'un tram isocràtic i un tram lineal. Les proves es van fer doncs cercant primer un percentatge d'acetonitril per començar l'elució amb un gradient de pendent molt suau o isocràtic, i optimitzant després aquest pendent. Es va estudiar com afectava a la separació de les PA començar amb un 10%, 13%, 15% i 20% d'acetonitril. Un front de 10% en acetonitril seguit d'un gradient:

**Taula 2.15 Gradient amb un front 10% en acetonitril**

Temps (min)	Fase aquosa (%)	Acetonitril (%)	Aigua (%)
0	90	10	0
5	90	10	0
25	60	40	0
26	90	10	0
36	90	10	0

produïa l'efecte que es veu a la **Figura 2.24**.



**Figura 2.24. Barreja d'estàndards de poliamines resolta en un gradient amb un front 10% en acetonitril. 1: putrescina, 2: espermidina i 3: espermina.**

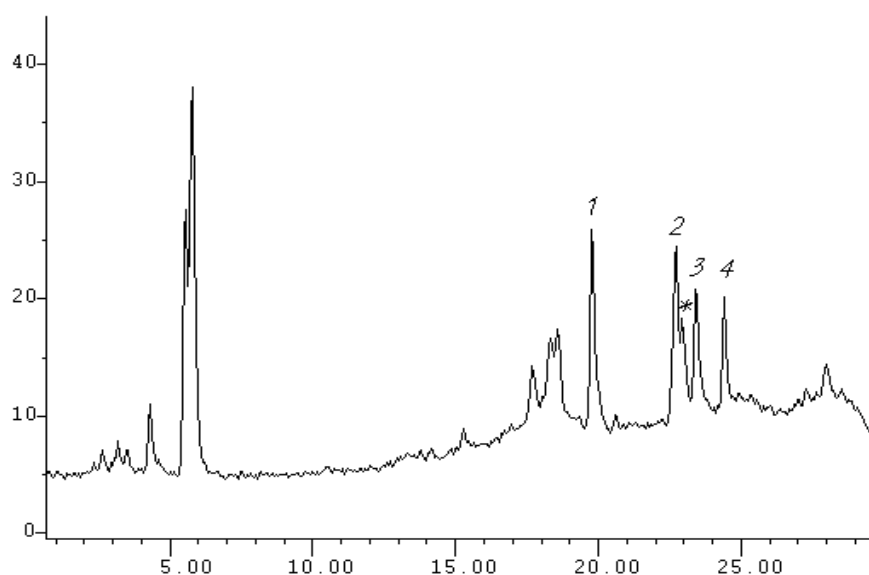
Els tres pics es resolien de forma completa, i aparentment no s'apreciava cap interferència amb productes secundaris de la derivatització amb el QCHS. Respecte al gradient que es volia millorar, això representava un estalvi en temps d'anàlisi d'uns 13 min. No es va comprovar la validesa d'aquest gradient en l'anàlisi de mostres perquè ja es disposava de dades sobre la separació de PA i AA: la distància entre l'últim AA eluït (fenilalanina) i la putrescina restava per sobre d'un minut de forma invariable en tots els gradients provats.

Per un front 13% en acetonitril seguit d'un gradient:

**Taula 2.16 Gradient amb un front 13% en acetonitril**

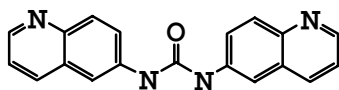
Temps (min)	Fase aquosa (%)	Acetonitril (%)	Aigua (%)
0	87	13	0
5	87	13	0
25	60	40	0
26	87	13	0
36	87	13	0

Es va obtenir el perfil de la **Figura 2.25**.



**Fig 2.25** Barreja d'estàndards de poliamines resolta en un gradient amb un front 13% en acetonitril. 1: putrescina, 2: espermidina, 3: espermina i 4: 1,7-diaminoheptà (estàndard intern).

Novament, hi va haver un guany quantitatiu de temps respecte al gradient anterior i la resolució dels pics resultava òptima. Es pot observar, malgrat això, un pic interferent entre els pics d'espermidina i espermina, marcat amb un asterisc a la **Figura 2.25**. Aquesta substància és un producte secundari de la reacció de derivatització, descrit i caracteritzat per Weiss com bisquinolinilurea:



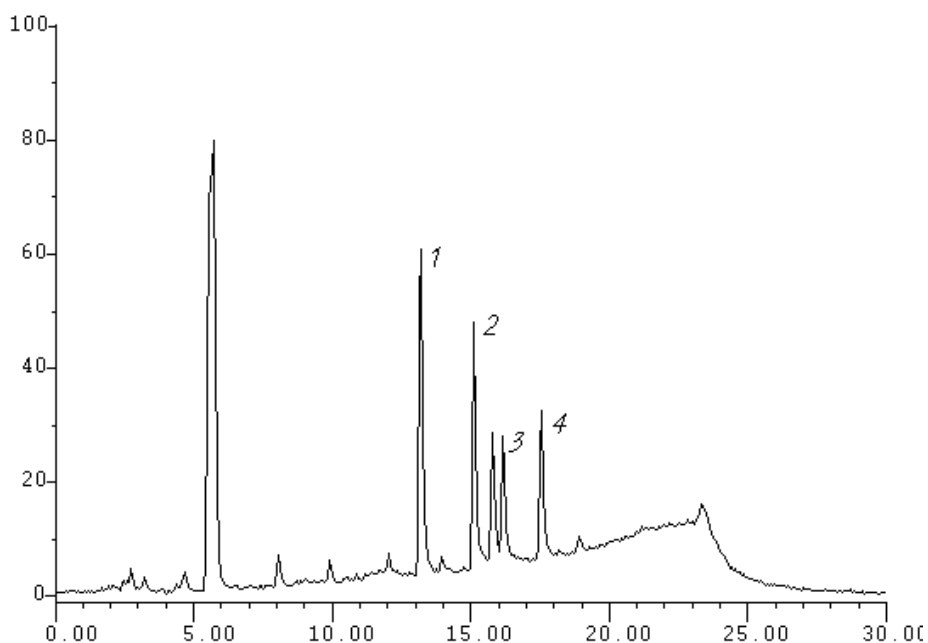
La seva presència comprometia la quantificació de l'espermidina i la seva resolució dels pics veïns va ser una tasca difícil perquè presentava un comportament cromatogràfic erràtic. Per aconseguir-ho, es van provar diferents pendents del gradient a la zona d'elució de les PA. Aquestes proves estaven condicionades però, pel percentatge d'acetonitril inicial emprat.

Per treballar amb un front 15% en acetonitril es va dissenyar un gradient on ja no apareixia cap etapa isocràtica inicial (**Taula 2.17**), de forma que només hi havia un únic tram lineal amb un pendent més fort que l'anterior (2,25% acetonitril/min *vs.* 1,35% acetonitril/min) per a tota la separació. Els efectes que s'esperaven amb aquest canvi eren dos: (a) una elució més ràpida dels pics que poguessin aparèixer abans de les PA i (b) la resolució dels pics de bisquinolinilurea i espermidina.

**Taula 2.17 Gradient amb un front 15% en acetonitril (I) (Cohen i Michaud 1993)**

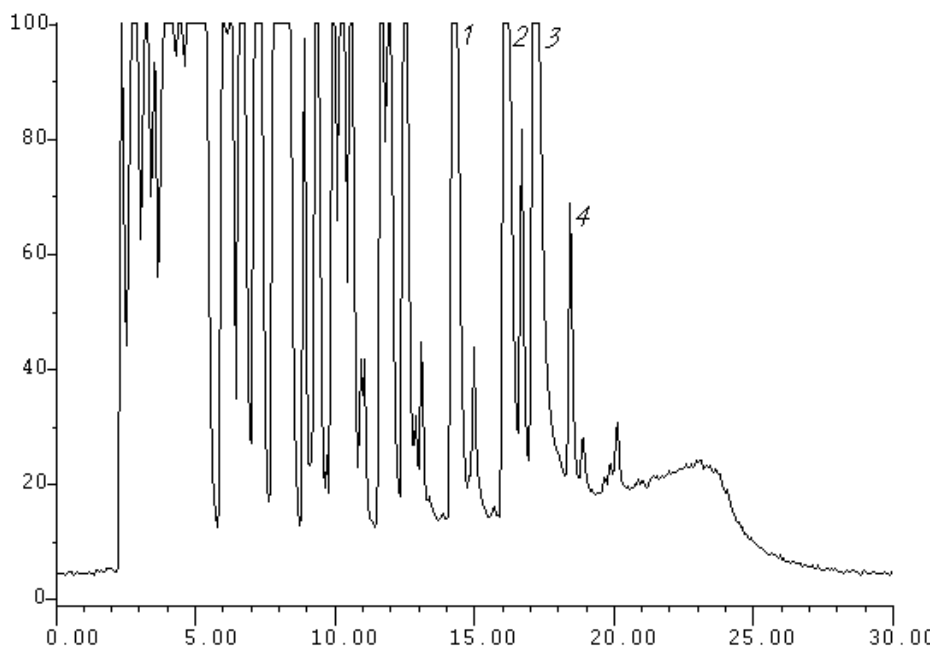
Temps (min)	Fase aquosa (%)	Acetonitril (%)	Aigua (%)
0	85	15	0
20	40	60	0
21	0	30	70
25	85	15	0
35	85	15	0

Es van obtenir cromatogrames com el de la **Figura 2.26**. El pic del producte secundari ja no es solapava amb el d'espermidina, i s'apropava molt al pic d'espermina. En canviar la



**Fig 2.26** Barreja d'estàndards de poliamines resolta en un gradient amb un front 15% en acetonitril. 1: putrescina, 2: espermidina, 3: espermina i 4: 1,7-diaminoheptà (estàndard intern).

forma del gradient la resolució de les PA es va mantenir, però la distància entre els pics d'espermidina i espermina va disminuir a la meitat amb un pic interferent al mig. Malgrat això, la presència d'aminoàcids no va plantejar problemes i el solapament dels pics a concentracions altes de PA (50 µM) no va impedir la quantificació com es pot veure a la **Figura 2.27**.



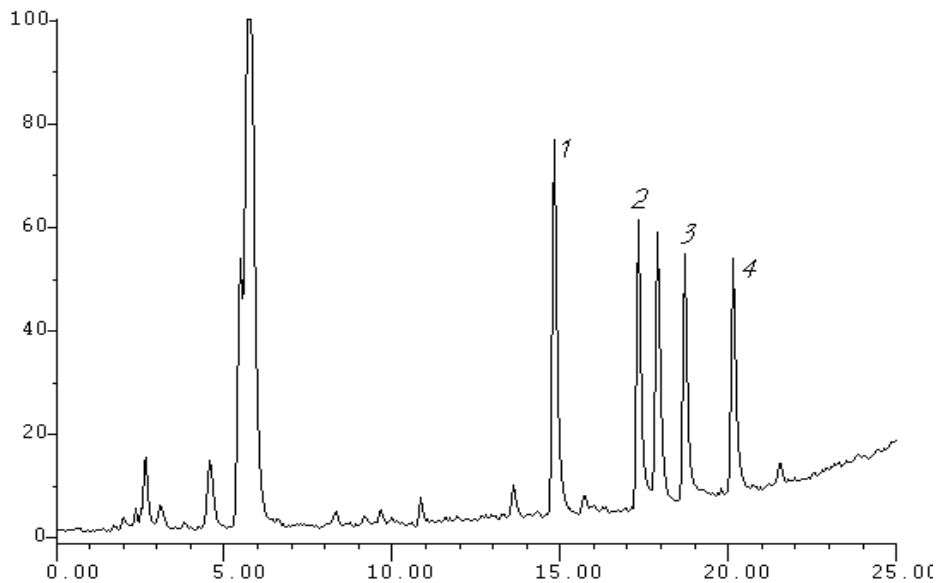
**Fig 2.27** Barreja d'estàndards de poliamines i aminoàcids resolta en un gradient amb un front 15% en acetonitril. 1: putrescina, 2: espermidina, 3: espermina i 4: 1,7-diaminoheptà.

Es va decidir baixar el pendent fins a 1,8% acetonitril/min, perllongant així, el temps d'anàlisi per un mateix 15% inicial:

**Taula 2.18** Gradient amb un front 15% en acetonitril (i II)

Temps (min)	Fase aquosa %	Acetonitril %	Aigua %
0	85	15	0
25	40	60	0
26	0	30	70
30	85	15	0
40	85	15	0

La separació corresponent va ser la de la **Figura 2.28**. Aquest nou pendent és una solució



**Fig 2.28** Barreja d'estàndards de poliamines i resolta en un gradient amb un front 15% en acetonitril. 1: putrescina, 2: espermidina, 3: espermina i 4: 1,7-diaminoheptà.

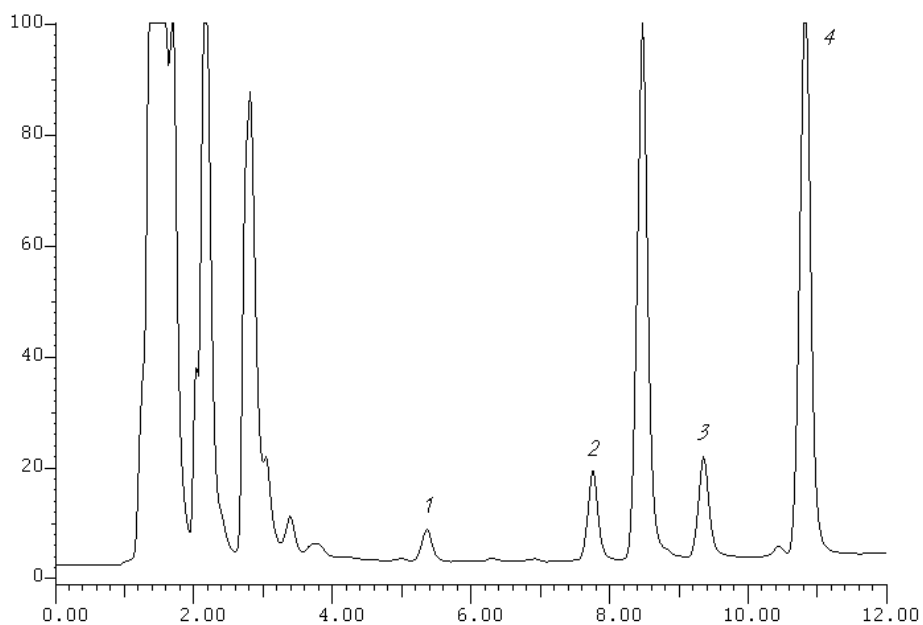
de compromís perquè permet quantificar l'espermidina malgrat tenir el producte secundari molt a prop, i per contra, fa sortir l'últim pic d'interès 2,5 minuts més tard. El pic d'espermina és el menys repetitiu amb els coeficients de variació més alts de tot el grup. Per això, es va preferir associar un error en les mesures al pic d'espermina. Aquest gradient es va fer servir en proves de tractament de mostra, i per determinacions de paràmetres de qualitat de l'instrument.

Les proves fetes amb un front 20% en acetonitril van ser conclusives. Amb aquest percentatge inicial i un pendent de 1,6% acetonitril/min, els aminoàcids i altres molècules interferents dels eritròcits eluïen de la columna en un pic únic a  $t < 5$  min. La cua del pic es solapava lleugerament amb el pic de putrescina però no impedia la seva quantificació. Per determinar PA en mostres de eritròcit i cultius de cèl·lules el gradient optimitzat va ser el següent:

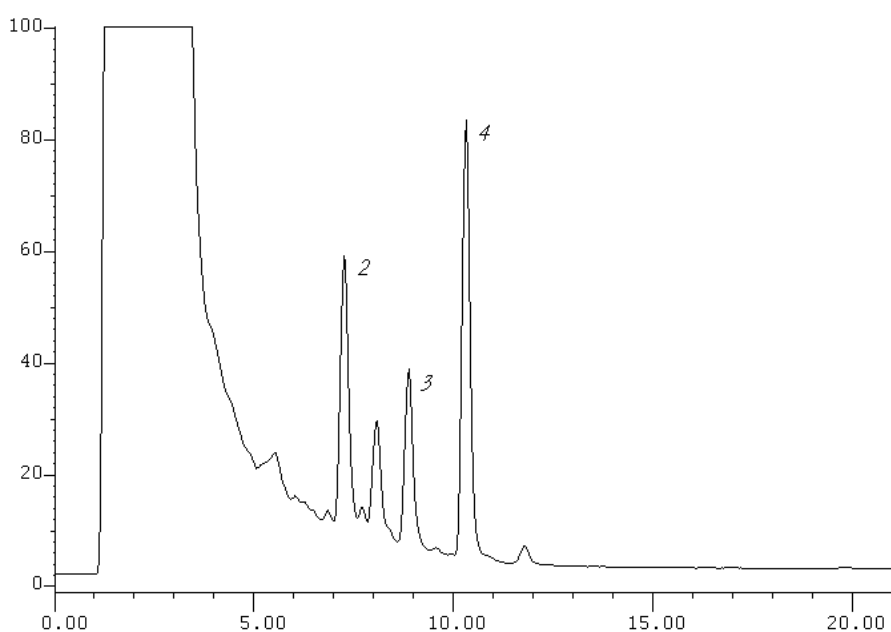
**Taula 2.19. Gradient amb un front 20% en acetonitril**

Temps (min)	Fase aquosa %	Acetonitril %	Aigua %
0	80	20	0
12,5	60	40	0
13	0	0	100
16	0	0	100
17	80	20	0
27	80	20	0

La zona d'elució de PA presentava una resolució òptima sense interferents i amb el patró de cinc pics característics com es pot apreciar a les següents mostres cromatografiades (**Figures 2.29 i 2.30**).



**Fig 2.29** Mostra de cèl·lules Caco-2 resolta en un gradient amb un front 20% en acetonitril. 1: putrescina, 2: espermidina, 3: espermina i 4: 1,7-diaminoheptà (estàndard intern).



**Fig 2.30** Mostra de sang resolta en un gradient amb un front 20% en acetonitril. 1: putrescina, 2: espermidina, 3: espermina i 4: 1,7-diaminoheptà (estàndard intern).

El gradient aconseguit va representar un guany de 33 min en el temps d'anàlisi total respecte al gradient inicial (Merali i Clarkson 1996) i va permetre cromatografiar el doble de mostres en el mateix temps. Treballant amb un mètode d'injecció manual, aquest guany era especialment important. Per altra part, la resolució obtinguda entre els pics de PA també va ser considerablement major que la publicada ( $R_s \geq 1,2$ ). A les dues darreres mostres es van obtenir valors de  $R_s \geq 3,6$ ; això permetia afrontar millor la presència d'interferents inesperats com la bisquinolinilurea.

### 2.2.1.4 Detecció per fluorescència

#### 2.2.1.4.1 Propietats fluorescents dels derivats quinolinilaminocarbonil de les poliamines

La reacció de les PA amb el QCHS produeix derivats fluorescents que tenen tots els grups amino acoblats a residus QAC. Així doncs, cada poliamina genera una única espècie molecular. Quan s'irradien amb llum UV de  $\lambda_{\text{ex}} = 248$  nm els derivats presenten les següents propietats:

**Taula 2.20 Propietats fluorescents de les QAC-PA**

	$\epsilon_{248}$	Q ( $\lambda_{\text{ex}} = 248$ nm)
Putrescina	100,57	0,203
Espermidina	131,56	0,096
Espermina	130,68	0,092
1,7-diaminoheptà	117,01	0,346

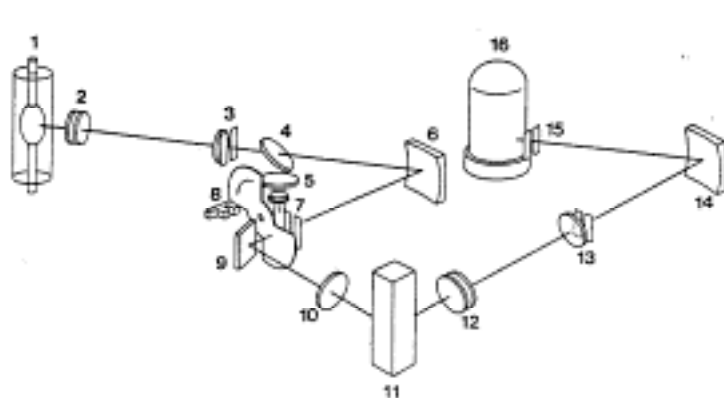
Els derivats de l'espermidina i l'espermina absorbeixen més radiació a 248 nm que la resta com indiquen els valors d'absortivitat molar ( $\epsilon$ ). La major presència de grups QAC a la seva estructura ho justifica. En canvi, els rendiments quàntics de l'emissió fluorescent (Q) són més grans per l'estàndard intern i la putrescina i, en conseqüència, mostren uns pics més grans per a una mateixa concentració d'analit. La causa d'aquest fenomen és la rigidesa de la molècula. L'espermidina i l'espermina presenten una estructura més flexible per la presència de grups amino entre les cadenes hidrocarbonades i aquestes parts no rígides afavoreixen la desactivació d'electrons excitats sense radiació.

La reacció de derivatització en solució aquosa porta associada l'aparició de tres productes secundaris amb propietats fluorescents. Per una part, la hidròlisi del reactiu genera aminoquinolina. I per altra, el reactiu reacciona amb sí mateix produint dos derivats de la urea: quinolinilurea i bisquinolinilurea. Només aquest últim planteja problemes per resoldre les PA com s'ha explicat a l'apartat anterior.



Per detectar les PA es va fer servir un espectrofluorímetre Kontron SFM25. Aquest instrument òptic consta d'una font, dos monocromadors per seleccionar longituds d'ona i un detector fotoelèctric. A la **Figura 2.31** es pot veure un diagrama dels components de l'instrument facilitat per la casa comercial. La font és una làmpada d'arc de xenó de 150 W que produeix un espectre continu des d'aproximadament 300 a 1300 nm. El feix que produeix la font passa a través d'un monocromador d'excitació i aquest transmet només la radiació UV o visible que provocarà la fluorescència de la mostra. La fluorescència es propaga en totes direccions i es detecta en angle recte respecte al feix d'excitació. Després de travessar un segon monocromador que isola un pic fluorescent per mesurar-lo, la radiació emesa arriba a un detector fotoelèctric. El senyal recollit en el fotomultiplicador s'envia a un amplificador i finalment la intensitat del senyal amplificat serveix de paràmetre analític.

L'alt voltatge del fotomultiplicador va ser l'únic paràmetre del detector que es va optimitzar per a l'anàlisi de PA. Es va fer en funció del rang de concentracions de PA amb el qual es volia treballar (0,25-40  $\mu\text{M}$ ). L'instrument permet seleccionar el voltatge dintre del rang 100-999 V. A mesura que es pujava el voltatge la sensibilitat del mètode augmentava, i es detectaven concentracions més baixes de PA. Però amb voltatges superiors a 600 V el senyal que proporcionen concentracions altes de PA saturava la unitat de recollida de dades, i el límit superior de linealitat s'escurçava fins a 10  $\mu\text{M}$ . Es va seleccionar 600 V com a alt voltatge de treball.



**Figura 2.31** Esquema dels components de l'espectrofluorímetre (manual d'instruccions Kontron SFM25, Kontron Instr., Milano, Italia):

- |  |   |
|--|---|
| 1- Làmpada de xenó   | 9- Mirall pla   |
| 2- Lent de col·limació                                     | 10- Lent de col·limació                                   |
| 3- Seleccionable a l'entrada del monocromador d'excitació  | 11- Cel·la per mostres                                    |
| 4- Separador del feix                                      | 12- Lent de col·limació                                   |
| 5- Detector de referència (fotodiode)                      | 13- Seleccionable a l'entrada del monocromador d'emissió  |
| 6- Xarxa d'excitació                                       | 14- Xarxa d'excitació                                     |
| 7- Seleccionable a la sortida del monocromador d'excitació | 15- Seleccionable a la sortida del monocromador d'emissió |
| 8- Interruptor de tall ( <i>chopper</i> )                  | 16- Fotomultiplicador                                     |

### 2.2.1.5 Anàlisi i tractament de dades

Per recollir el senyal de l'espectrofluorímetre es va fer servir el programa informàtic 712 HPLC System Controller de Gilson. El senyal analògic que sortia de l'espectrofluorímetre tenia una magnitud d'entre 2,5mV (línia de base inicial) i 1V, i es transformava en un senyal digital mitjançant una interfase RS-232. La variació del senyal amb el temps de cada cromatograma es recollia i s'enmagatzemava sense cap tractament en arxius independents. Després, s'analitzava amb el mateix software per a obtenir els temps de retenció i les dades d'integració dels pics cromatogràfics. Aquestes dades s'exportaven finalment a un full de càlcul de Microsoft Excel 7 on es construïen les corbes de calibratge, es realitzaven els càlculs estadístics i s'obtenien les concentracions de PA a les mostres.

Per evitar la incertesa que s'introduïa en la injecció de mostres es va adoptar el mètode de l'estàndar intern. A cada mostra i estàndar s'afegia 1,7-diaminoheptà en quantitat suficient per aconseguir una concentració final de 5  $\mu\text{M}$ . El paràmetre analític emprat per representar front a les concentracions va ser l'àrea del pic de l'analit corregida per l'àrea de l'estàndar intern ( $A_{\text{pic}}/A_{\text{e.i.}}$ ). El valor d'aquest quocient en les condicions de treball emprades oscilava entre 0 i 2.

Com a tècnica de quantificació es va escollir la determinació de l'àrea del pic, donat que la resolució en la separació ho permetia. L'àrea calculada és la que es troba limitada pels marges del pic i la línia de base per defecte (**Figura 2.32**) i es pot modificar mitjançant tècniques de construcció de línia de base. Cada pic del cromatograma es va integrar per separat segons les seves propietats: solapament amb pics veïns, deriva gradual de la línia de base i asimetria característica.

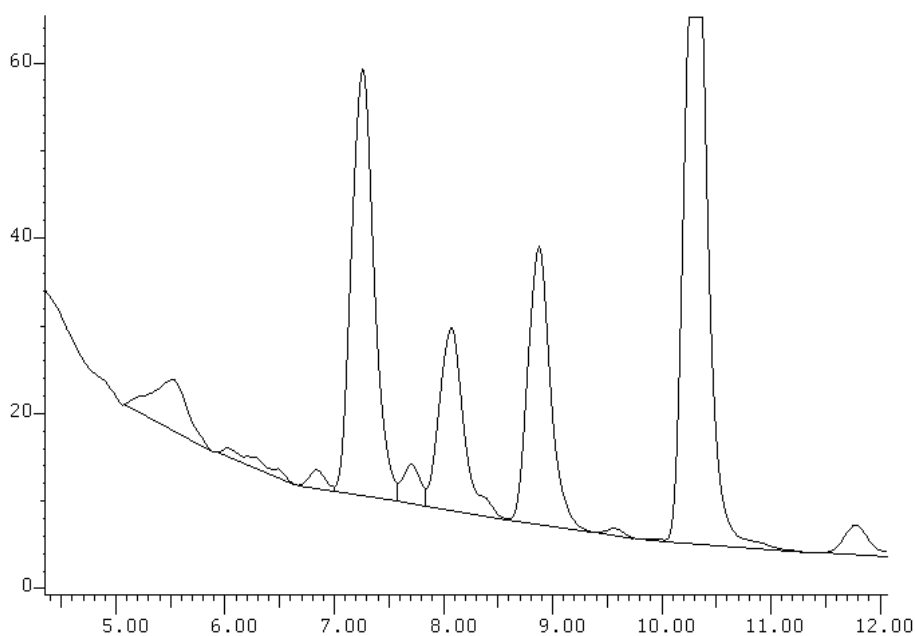


Fig 2.32 Integració de pics cromatogràfics.

El càlcul del contingut de les PA de les mostres es va fer per interpolació a partir de les respectives corbes de calibratge construïdes amb solucions estàndard. L'interval de concentració de les corbes comprenia inicialment entre 0,25 i 40  $\mu\text{M}$ . Aquest interval era susceptible de perllongar-se a valors superiors però les concentracions habituals trobades a les mostres no ho van fer necessari.

## **2.2.2 Altres mètodes**

### **2.2.2.1 Cultiu de cèl.lules**

#### *CT-26*

En el nostre laboratori, les CT-26 es cultivaven en medi *Dulbecco's Modification of Eagle Medium* (DMEM) amb piruvat, glucosa i piridoxina, 10% de sèrum fetal boví i antibiòtics (100 IU/L de penicilina i 100 µg/mL d'estreptomicina) en flascó de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. El canvi de medi es feia cada 2-3 dies i les cèl.lules es subcultivaven per tripsinació resembrant 50.000 cèl.lules/mL. El contingut en poliamines del sèrum fetal boví es va eliminar a través de una membrana de diàlisi per molècules d'un pes molecular inferior a 3.500 UMA durant 24 h. Per mesurar la síntesi d'ADN durant la fase logarítmica de creixement, les cèl.lules es van sembrar en plaques de 96 pous a raó de 1.000 cèl.lules per pou (20 pous per dosi experimental), es van cultivar durant 24 h i llavors es van afegir als cultius les substàncies experimentals (putrescina o putrescina i aminoguanidina (AMG)) i el marcador de síntesi d'ADN (bromodesoxiuridina). Per determinar l'activitat i l'ARNm de l'ODC i les concentracions de PA es van utilitzar cultius (triplicats) en flascons de 75 cm<sup>2</sup>.

#### *K-562*

El cultiu de K-562 es va fer en suspensió en medi RPMI 1640 amb 10% de sèrum fetal boví, penicilina 50 U/mL i estreptomicina 50 µg/mL en flascons de 75 cm<sup>2</sup>. El cultiu s'iniciava rutinàriament amb 100.000 cèl.lules/mL, i les cèl.lules es subcultivaven quan s'assolien 1.000.000 cèl.lules/mL retirant el volum necessari de cultiu i afegint medi fresc. En 2-3 dies el cultiu assolí una densitat limitant. La sublínia K-562/D20 es cultivava en les mateixes condicions amb 20mM DFMO i assolí la saturació en 5-6 dies. Es va determinar experimentalment que una concentració de putrescina 10 µM durant 18 h indueix la producció d'AZ de forma reproducible en cèl.lules K-562. En canvi, DFMO 20mM en el medi de cultiu durant 24 h inhibeix l'expressió d'AZ a nivells indetectables.

#### *Caco-2*

El cultiu de Caco-2 es va fer en medi DMEM amb 10% de sèrum fetal boví, penicilina 50 U/mL i estreptomicina 50 µg/mL en flascons de 75 cm<sup>2</sup>. El cultiu s'iniciava rutinàriament amb 50.000 cèl.lules viables/mL i es subcultivava als 5-6 dies quan s'arribava a subconfluència (250.000 cèl.lules/mL) amb tripsina-EDTA. El creixement de cultius en monocapa d'aquestes

cèl.lules es podia perllongar fins a 25-30 dies. Al dia 6-7 el cultiu es feien confluent, mentre la diferenciació de les cèl.lules continuava. Per induir o inhibir l'expressió d'AZ en Caco-2 es van utilitzar les mateixes condicions emprades per K-562.

### ***2.2.2.2 Extracció de mostres intestinals humanes***

En l'estudi de les poliamines en la mucosa intestinal de pacients SIC amb jejunostomia (Grup II.B) es van practicar biòpsies de mucosa jejunal a través del forat de jejunostomia dels pacients. Espècimens de 50-100 mg de teixit van ser obtinguts per l'endoscopista a uns 10 cm de l'estoma utilitzant uns fòrceps de biòpsia FB-24U-1 i un fibrogastroscoopi GIFQ30 (ambdós d'Olympus, Hamburg, Germany). En el mateix estudi mostres de mucosa de budell prim (jejú o ili) dels individus control van ser disseccionades per un cirurgià amb instrumental estèril, a partir de la peça quirúrgica acabada de resecat. Totes les mostres es rentaven amb PBS estèril fred, s'introduïen tubs de polipropilè i es congelaven immediatament en N<sub>2</sub>(l).

En els estudis en pacients amb càncer colorectal (Grup III) mostres quirúrgiques de mucosa macroscòpicament normal i d'adenocarcinoma de còlon de 100-200 mg van ser disseccionades per un cirurgià immediatament després de la resecció del còlon i congelades en N<sub>2</sub>(l). Replicats de les mostres d'estudi van ser caracteritzats histopatològicament.

En tots els estudis les mostres congelades es polvoritzaven en un morter metàl·lic mantingut a molt baixa temperatura per immersió en N<sub>2</sub>(l), es repartien en fraccions i s'emmagatzemaven a -80°C. El dia de realitzar els assajos les fraccions polvoritzades s'homogeneïtzaven en el tampó adient per cada assaig.

### ***2.2.2.3 Tractament estadístic dels valors de referència de poliamines en sang***

Les anàlisis de poliamines en sang es van fer en mostres de sang-citrat recollides mitjançant la tècnica d'extracció al buit entre les 8 i les 10 h del matí després que els participants haguessin estat en dejú un mínim de 12 h. El tractament de les mostres per la seva anàlisi cromatogràfica ha estat descrit a l'apartat 2.2.1. Juntament amb les concentracions de PA en eritròcit es van recollir i tractar les dades dels següents paràmetres eritrocitaris: recompte de cèl.lules, hemoglobina, hematòcrit, volum corpuscular mitjà, concentració d'hemoglobina corpuscular mitjana i concentració mitjana d'hemoglobina per analitzar l'existència d'associacions entre variables. Les dades experimentals generades en el nostre grup d'estudi es van tractar seguint el procediment pel tractament estadístic de valors de referència.

### *Partició dels valors de referència*

Vam estratificar els pacients de referència i els valors de referència corresponents en diferents subclasses d'acord amb el seu sexe, edat i hàbit tabàquic. Aquest últim és sovint considerat un criteri d'exclusió de candidats que han de formar part d'un grup de valors de referència associats a la salut tal i com ho és el consum d'alcohol. (Young *et al.* 1975). Nosaltres no el vam considerar com a tal criteri (però si el vam considerar com una subclasse de partició) fonamentalment perquè la seva influència sobre les variables d'estudi no ha estat demostrada, i perquè en el nostre medi aquest és encara un hàbit molt estès. L'edat es va categoritzar en dos grups (18-39 anys i >39 anys) i el tabaquisme en fumadors (tots els que fumaven en el moment de l'estudi o ho havien fet fins menys d'un any abans de l'estudi) i no fumadors (la resta).

### *Identificació de valors atípics*

Es va utilitzar la prova del rang (Reed *et al.* 1971) per identificar valors extrems de les variables com atípics.

### *Establiment de valors de referència*

Per la determinació dels percentils 2,5 i 97,5 que delimiten l'interval central 95% de la distribució de les variables vam utilitzar un mètode paramètric (IFCC Expert Panel on Theory of Reference Values 1983). Previament, vam comprovar la bondat de l'ajust de la distribució de referència a una hipotètica distribució gaussiana mitjançant la prova de Kolmogorov-Smirnov.

### *Transformació de les dades de l'espermina*

Com els valors de l'espermina mostraven una asimetria positiva (0,87) es va aplicar una transformació logarítmica,  $y = \ln(x)$ , en l'estimació dels límits de referència.

### *Equivalència de les unitats de concentració de les poliamines*

Es va comprovar la significació estadística dels coeficients de Pearson (espermidina) i Spearman (espermina) mitjançant proves de significació de  $r$  a partir del seu error típic. Les equacions que relacionen ambdues unitats de concentració es van obtenir amb un ajust de mínims quadrats.

### *Associació entre les poliamines i els paràmetres eritrocitaris.*

Es va comprovar la significació estadística dels coeficients de Pearson (espermidina) i Spearman (espermina) mitjançant proves de significació de  $r$  a partir del seu error típic.

#### **2.2.2.4 Peroxidació lipídica**

Es va mesurar l'alliberament de malonildialdehid (MDA) en eritròcits després de l'estimulació *in vitro* amb peròxid d'hidrogen en presència d'azida sòdica d'acord amb el mètode de Cynamon (1985). Es van obtenir mostres de sang-citrat dels subjectes estudiats mitjançant la tècnica d'extracció al buit entre les 8 i les 10 h del matí després d'un dejú de 12 hores. Els eritròcits es van aïllar barrejant sang fresca anticoagulada amb EDTA amb 3% dextrà i deixant-la reposar 45 min a temperatura ambient. L'empaquetat d'eritròcits resultant es va dividir en 13 replicats corresponents a 1 alíquota no estimulada, 6 replicats estimulats amb 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampó fosfat (pH = 7,4) i 6 replicats estimulats amb 10 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amb una dosi d'estudi d'una de les poliamines (putrescina, espermidina o espermina) diluïda en tampó fosfat, en concentracions finals 100, 500 and 1000 µM. Per l'espermidina i l'espermina l'assaig es va fer en tres mostres de tres individus, mentre que l'efecte de la putrescina es va provar en una única mostra de tres individus. Després d'afegir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i PA simultàniament les cèl.lules es van incubar a 37 °C amb agitació durant 1 h. Seguidament, es va mesurar el contingut de MDA mitjançant reacció amb àcid tiobarbitúric (TBA) a 100 °C durant 15 min (Stocks i Dormandy 1971). El TBA es va preparar com una solució 1% (pes/volum) en NaOH 0,05 M. La densitat òptica es va mesurar a 532 i 600 nm. Els resultats es van calcular considerant un coeficient  $\epsilon = 1.56 \times 10^5$  i es van expressar com nmols per gram d' hemoglobina (HGB).

#### **2.2.2.5 Proliferació cel.lular**

La mesura de la síntesi d'ADN es considera representativa de la proliferació cel.lular (Freshney 1992). La síntesi d'anticossos monoclonals específics per l'anàleg de la timidina bromodesoxiuridina (BrdU) (Gratzner 1982) va permetre el desenvolupar un assaig ELISA. Aquest mètode mostra una bona correlació amb la incorporació de timidina tritiada ( $r = 0,990$ ) en mioblasts porcins (Perros i Weightman 1991).

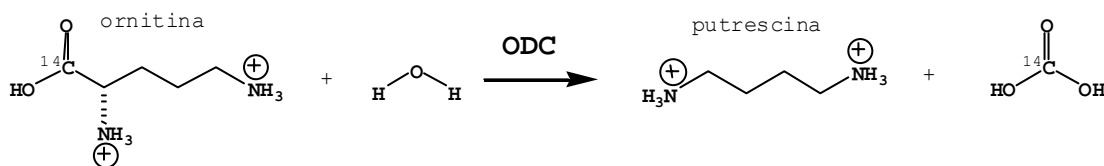
L'assaig ELISA BrdU es va utilitzar per comprovar l'efecte proliferatiu de la putrescina exògena en cèl.lules CT-26 i per valorar si aquest efecte depèn de la conversió intracel.lular de la putrescina a  $\gamma$ -aminobutiraldehid. (Farriol *et al.* 2001). Els experiments de proliferació començaven sembrant 10<sup>3</sup> cèl.lules/pou en 0,1 mL/pou de medi DMEM amb 10% sèrum fetal boví (~ 3.000 cèl.lules/cm<sup>2</sup>) en plaques de microtitulació de 96 pous i incubant durant 24 h (el cultiu supera la fase Lag d'adaptació). Després es canviava a medi contenint sèrum dialitzat (amb o sense 1 mM AMG) altres 24 h i, finalment, les cèl.lules s'exposaven a concentracions creixents de putrescina (100, 550 o 1.000 µM) en absència o en presència de 1 mM AMG. El temps òptim d'exposició per observar un potencial efecte proliferatiu es va determinar experimentalment en diferents trams de la fase de creixement exponencial del cultiu a 24, 48 i 72 h (per temps d'exposició superiors a 24 h es canviava el medi diàriament). El marcatge amb BrdU es va mesurar durant 24 h (síntesi acumulativa d'ADN) ja que incubacions per períodes curts (1-2 h) no produïen valors de densitat òptica (DO) reproduïbles. D'aquesta manera, s'afegien 10 µL de BrdU 100 µM 24 h abans d'acabar els temps experimentals d'exposició a putrescina.

Per quantificar la BrdU incorporada a les cadenes d'ADN es retirava el medi, es fixaven les cèl·lules a la placa i es desnaturalitzava l'ADN amb una solució d'àcid acètic/etanol. L'immunoassaig començava bloquejant la unió inespecífica de l'anticòs amb albúmina de sèrum boví en PBS/Tween-20. Seguidament, s'incubaven les plaques amb l'anticòs anti-BrdU conjugat amb peroxidasa diluït 1:100, durant 90 min a temperatura ambient. Els complexos immunes resultants es detectaven amb un substrat de la peroxidasa, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), i el color desenvolupat en la reacció es mesurava a 450 nm en un fotòmetre per plaques de microtitulació. Els valors de  $DO_{450}$  es correlacionen directament amb la quantitat d'ADN sintetitzat i per tant, amb el nombre de cèl·lules proliferants en cultiu. En cada experiment s'afegien dos controls en triplicat a les mostres: un blanc de l'assaig (sense cèl·lules però amb la resta de components de l'assaig) per obtenir informació sobre la unió inespecífica del BrdU i de l'anticòs anti-BrdU a la placa, i un control d'unió inespecífica (sense BrdU afegit) que dona informació sobre la unió de l'anticòs anti-BrdU en absència de BrdU. El valor del blanc es restava a tots els valors de l'experiment.

### 2.2.2.6 Activitat enzimàtica ornitina decarboxilasa

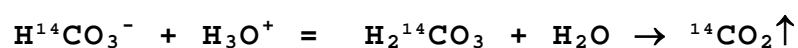
#### FONAMENT

L'ornitina decarboxilasa (ODC; [EC 4.1.1.17]) és un enzim intracel·lular que catalitza de forma preferent la formació de putrescina a partir de L-ornitina (Pegg i Williams-Ashman 1968). Pot actuar també sobre la L-lisina formant cadaverina i  $CO_2$  però la  $K_m$  d'aquesta reacció és 100 vegades més gran que per l'ornitina (Pegg i McGill 1979). Els mètodes existents per determinar l'activitat ODC depenen de la quantificació d'un dels dos productes de la reacció. La gran majoria de les dades experimentals d'activitat ODC que es poden trobar a la bibliografia s'han obtingut amb mètodes que utilitzen  $[1-^{14}C]$ -ornitina i impliquen la captura del  $^{14}CO_2$  alliberat (**Figura 2.33**).



**Figura 2.33** Decarboxilació del substrat marcat en l'assaig d'activitat ODC.

Aquest principi va ser aplicat per primera vegada per determinar l'activitat biosintètica ODC en procarïotes per Morris i Pardee (1965) i modificat posteriorment per l'assaig de l'ODC eucariota (Siimes i Jänne 1967, Russell i Snyder 1968). La reacció entre el substrat radioactiu i l'enzim de la mostra es duu a terme en un tub de vidre tancat hermèticament amb un tap de goma i s'atura per injecció d'una solució d'un àcid fort que serveix, a la vegada, per desplaçar l'equilibri:



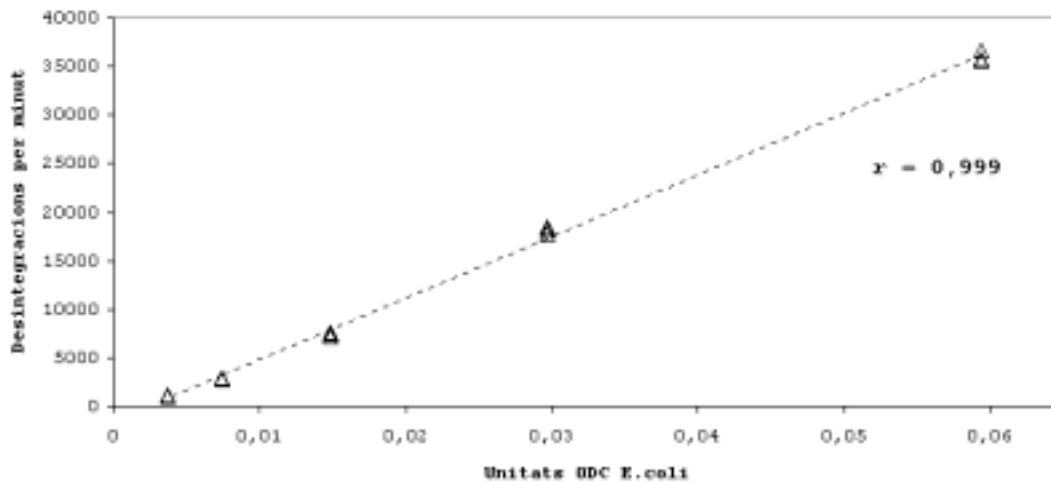


totalment a la dreta i per evaporar el  $^{14}\text{CO}_2$  produït a la barreja de reacció durant una incubació subsegüent de 30 min. El  $^{14}\text{CO}_2$  després es captura en un petit reservori intern suspès sobre la barreja de reacció amb una agulla clavada a la part interna del tap. El reservori conté una solució bàsica (NaOH o un altre substància compatible amb el líquid de centelleig) que atrapa de forma estable el diòxid de carboni.

#### ASSAIG

En els nostres experiments vam aplicar bàsicament les condicions descrites per Russell i Snyder (1968). El tampó inicialment utilitzat de fosfat de sodi i potassi 10 mM va ser substituït per tampó Tris-HCl 100mM en comprovar que es produïa una inhibició d'un 20% en l'activitat enzimàtica de les mateixes mostres dissoltes en el primer tampó respecte al segon tampó (Garewall *et al.* 1992). Breument, mostres de cultius cel.lulars, mucosa intestinal humana o proteïna recombinant d'*E. Coli* s'homogeneïtzaven en tampó de lisi (0,1M Tris-HCl, 1mM EDTA, 2,5mM DTT, 2mM PLP, 1% Triton X-100 i 5 mg/L fluorur de fenilmetilsulfonil pH = 7,5) a raó de: cultiu en flascó de 75 cm<sup>2</sup>/200 µL, 50 mg teixit/350 µL i cultiu o/n 2 mL/200 µL, respectivament. Els homogeneïtzats es centrifugaven a 50.000 × g, 20 min a 4°C, i la concentració de proteïna soluble total es determinava en els sobrenedants. L'assaig enzimàtic es realitzava amb una quantitat mínima de proteïna total de 1 mg per cultius cel.lulars, 2-10 mg per mucosa intestinal i 2 µg per proteïna recombinant. Les mostres s'afegien al tub a 4°C, s'afegia la solució de substrat ( $^{14}\text{C}$ -ornitina/ornitina-2HCl) i els tubs es tapaven amb un tap de goma amb un reservori contenint 100 µL de solució comercial NCS suspès sobre la reacció. Els tubs s'incubaven en un bany d'aigua a 37°C amb agitació durant 1 h. Després d'aquest temps, la reacció s'aturava de forma simultània en tots els tubs disposant la gradeta en un bany d'aigua amb gel. S'injectaven 500 µL d'àcid tricloroacètic 5% amb una xeringa d'insulina de 1 mL a través del tap de goma. Una última incubació a 37°C, 30 min aturada posteriorment en aigua amb gel, precedia la mesura de la radioactivitat. Els reservoris amb NCS es recollien cuidadosament, es submergien en tubs de centelleig amb 5 mL de líquid de centelleig i s'agitaven. El recompte de la radioactivitat es feia a les 2 h i es repetia a les 24 h de l'assaig.

Per les feines de validació de l'assaig vam utilitzar proteïna ODC purificada d'*E.coli* (Sigma) en la comprovació de la linealitat de l'assaig, com a control positiu i en experiments d'addició estàndar, i l'inhibidor DFMO per detectar la possible formació de  $^{14}\text{CO}_2$  per reaccions independents de l'ODC en les cèl.lules i mostres intestinals. Vam comprovar la linealitat de la reacció enzimàtica entre 30 i 90 min en mostres i en proteïna purificada, i la proporcionalitat del senyal radioactiu en funció de la quantitat de proteïna en l'assaig (**Figura 2.34**).



**Figura 2.34** Linealitat de l'assaig ODC en funció de la quantitat de proteïna ODC E.coli purificada present en l'assaig.

L'activitat catalítica de l'ODC s'expressa com a producte format per unitat de temps. La unitat més utilitzada ha estat el nanomol o picomol (depenent del teixit o del tipus de cèl·lules) de  $\text{CO}_2$  format en 60 minuts. Són testimonials els laboratoris que segueixen les recomanacions de la IUPAC i expressen l'activitat ODC en katal de  $\text{CO}_2$ . La concentració de l'enzim expressada en termes d'activitat per massa d'especimen també ha assolit un consens general i es fa majoritàriament per miligram de proteïna soluble encara que hi ha un nombre important de treballs que donen activitats per miligram de teixit. L'aspecte que porta més imprecisió a l'hora de poder comparar valors absoluts d'activitat ODC publicats per diferents laboratoris són les petites modificacions metodològiques o els canvis en els paràmetres experimentals de l'assaig com per exemple el tipus de tampó, el pH, la força iònica, la puresa del substrat, la temperatura, la concentració dels activadors i agents estabilitzants de la reacció, el tipus de líquid de centelleig. Aquests paràmetres condicionen la velocitat de la reacció enzimàtica i, encara que molt sovint s'especifiquen convenientment en els treballs publicats, es desconeix la importància dels canvis que involucren en el valor de les unitats d'activitat ODC. El càlcul de l'activitat, en el nostre cas, es feia de la manera següent:

- (a) Càlcul del  $^{14}\text{CO}_2$  generat en 1 hora a partir del recompte d'U Dpm:

$$U / (2.22 \times 10^9 \text{ Dpm}) = V \text{ mCi}$$

i de l'activitat específica de la solució de substrat:

$$V \text{ mCi} \times (1 \text{ mmol} / 2 \text{ mCi}) = W \text{ mmol } ^{14}\text{CO}_2$$

- (b) Activitat ODC considerant la proteïna soluble total en l'assaig:

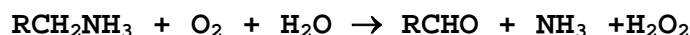
$$(W \times 10^6) / P = [\text{nmol CO}_2 / \text{h} \cdot \text{mg proteïna}]$$

(1 unitat ODC = quantitat d'enzim que genera 1 nmol  $^{14}\text{CO}_2$  en 1 hora)

### 2.2.2.7 Activitat enzimàtica diamina oxidasa

#### FONAMENT

Les amina oxidases dependents de coure (EC 1.4.3.6) són una família d'enzims que catalitzen la desaminació oxidativa de varies amines biogèniques amb una especificitat de substrat molt variable entre els seus membres (High *et al.* 1999):

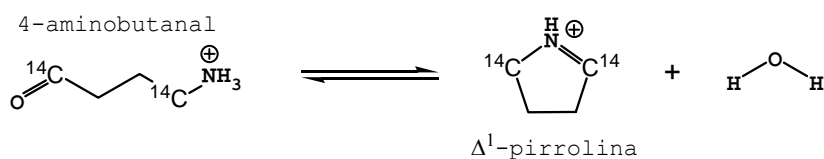


Aquests enzims estan formats per dues subunitats idèntiques de 60 -105 kDa amb un àtom de coure i un cofactor carbonílic unit de forma covalent a cadascuna. La diamina oxidasa (DAO), en particular, catalitza la desaminació d'amines de 3 a 6 carbonis i de la histamina i es caracteritza per un residu aminoàcidic modificat 6-hidroxi-dopa (TOPA quinona) que actua com a grup prostètic al centre actiu de l'enzim. El mecanisme de la reacció de desaminació actualment acceptat va ser proposat per Hartman i Klinman (1991). En ell l'enzim catalitza la conversió de putrescina a 4-aminobutanal ( $\gamma$ -aminobutilaldehid o acetilputrescina) a través d'una sèrie d'intermediaris imina quinona i quinolamina. Entre els mètodes existents per determinar l'activitat DAO el mètode radiomètric és el de preferència. Aquest utilitza un substrat doblement marcat ([1,4- $^{14}\text{C}$ ]-putrescina) ja que la molècula de putrescina és simètrica:



**Figura 2.35** Desaminació del substrat marcat en l'assaig d'activitat DAO.

i aprofita l'equilibri que el producte de la reacció té en solució aquosa amb la seva forma cíclica, la  $\Delta^1$ -pirrolina:



**Figura 2.36** Equilibri de les formes lineal i cíclica del 4-aminobutanal en fase aquosa.

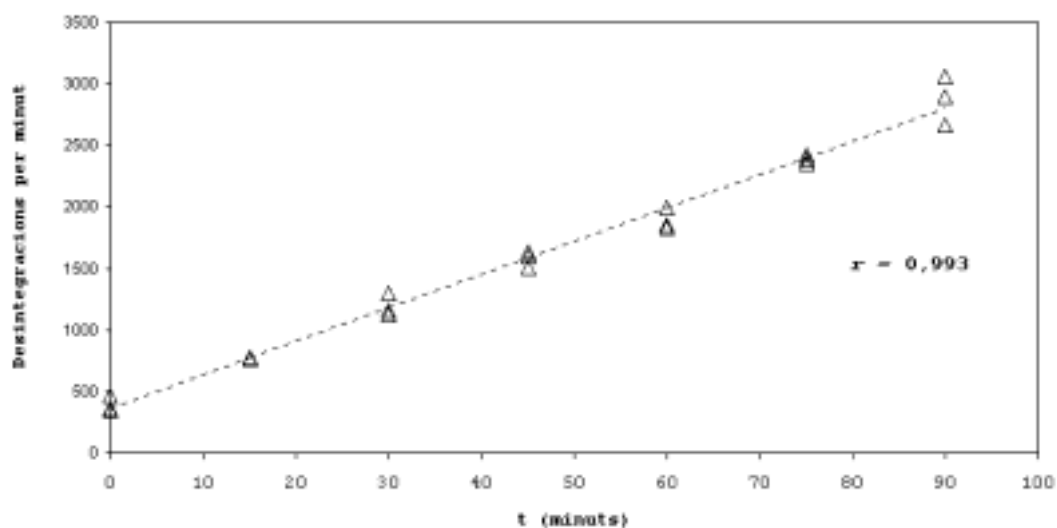
per separar la radioactivitat de substrat i producte amb una extracció en fase orgànica.

#### ASSAIG

L'assaig va ser originàriament dissenyat i publicat per Okuyama i Kobayashi (1961). En els nostres experiments es va utilitzar aquest mètode amb les modificacions fetes per Kusche i Lorenz

(1987). La reacció es duia a terme en tubs de vidre Pirex de 15 mL. La barreja de reacció consistia de 0,6 mL de tampó de fosfat de sodi (200 mM, pH = 7,6), 0,2 mL de mostra i 0,05 mL de solució de substrat (contenint 4,5 mM d'hidroclorur de putrescina i 1,0  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  d' hidroclorur de [1,4- $^{14}\text{C}$ ]-putrescina). La reacció s'aturava inicialment sobre un bany d'aigua gelada, afegint posteriorment 1 mL de tampó alcalí (NaOH 800 mM i  $\text{NaHCO}_3$  600 mM a pH = 12,2) al tub de reacció. L'extracció de la  $\Delta^1$ -pirrolina marcada es realitzava afegint 2 mL de toluè, barrejant molt bé les dues fases, congelant la fase aquosa en un bany d'etanol a  $-80^\circ\text{C}$  i capturant el toluè. La fase orgànica es barrejava amb 5 mL de líquid de centelleig i la radioactivitat es mesurava en un comptador de centelleig. Tres blancs es van incloure als experiments: (1) blanc sense activitat DAO amb aminoguanidina 0,1 mM per inhibir l'enzim; (2) blanc de mostra amb àcid perclòric 5% afegit a  $t = 0$  min i (3) blanc de reactius substituïnt el volum de mostra amb tampó fosfat.

Es va comprovar la linealitat de la reacció enzimàtica de la DAO intestinal humana durant 90 min prenent mesures per triplicat cada 15 minuts (**Figura 2.37**). Així mateix, es va comprovar la



**Figura 2.37** Linealitat de l'assaig DAO en funció del temps de reacció.

proporcionalitat del senyal obtingut (Dpm) en funció de la concentració de proteïna total en la mostra fent dilucions d'un mateix sobrenedant de budell (resultats no mostrats). Es va decidir fixar el període d'incubació a  $37^\circ\text{C}$  a 90 min per obtenir valors consistents en mostres amb activitat DAO baixa. L'activitat catalítica de la DAO es va expressar com Dpm de  $^{14}\text{C}$  produïdes en 60 min. La concentració de l'enzim es va referir a 1 miligram de proteïna soluble en els sobrenedants de les mostres.

### **2.2.2.8 ARN missatger de l'ornitina decarboxilasa**

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi es va treballar amb tres mètodes diferents per determinar de forma qualitativa, semiquantitativa o quantitativa els trànscrips d'ARNm-ODC presents en les mostres d'estudi. Inicialment, vam treballar amb un mètode de Northern-ELISA amb cèl·lules CT-26. Posteriorment, en el treball amb biòpsies humanes es van fer servir

tècniques de Northern blot amb detecció radioactiva ( $^{32}\text{P}$ ) i PCR quantitativa a temps real. En tots tres mètodes la passa inicial en el tractament de mostra consistia en l'extracció de l'ARN total en condicions d'alta puresa. Tant per cèl.lules com per mostres d'intestí vam utilitzar el mètode del tiocianat de guanidi-fenol-cloroform descrit per Chomczynski i Sacchi (1987) amb els kits comercials descrits a l'apartat 2.1.1. La qualitat i la integritat de l'ARN purificat en aigua lliure de RNases es comprovaven per quantificació espectrofotomètrica i fraccionament en gel d'agarosa 1 %, respectivament, abans d'emmagatzamar-ho a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.2.2.8.1 *ARNm-ODC per anàlisi Northern blot*

L'ARN purificat de les mostres es va fraccionar en gel d'agarosa a l'1 % amb formaldehid i es va transferir amb un col·lector de buit a una membrana de niló Hybond N+. Es va sintetitzar una sonda per a l'ODC: (a) amplificant per RT-PCR un fragment d'ARNm ODC de 540 nt a partir de tres mostres intestinals diferents, barrejant els productes, i (b) marcant radioactivament l'ADN complementari obtingut amb  $^{32}\text{P}$  mitjançant el kit Megaprime Random Labeling. Les membranes es van hibridar amb les sondes durant 20 hores en un forn d'hibridació. El senyal emès per la membrana es va recollir en un film d'autoradiografia per exposició durant 1 setmana.

#### 2.2.2.8.2 *ARNm-ODC per anàlisi Northern-ELISA*

Per detectar l'ARNm-ODC mitjançant un assaig ELISA es va sintetitzar una sonda específica marcada amb digoxigenina. Vam dissenyar una parell de primers per l'ARNm ODC, NE ODC sentit i NE ODC invers (veure **Taula 2.2**), utilitzant el programa OLIGO.EXE versió 3.4 a partir de la seqüència de l'ARNm de l'ODC de ratolí (MMODC) amb nombre d'accés a GenBank/EMBL M10624. L'especificitat dels primers es va comprovar amb el programa FASTA versió 3.3t07 (Pearson i Lipman 1988). Per sintetitzar la sonda, es van homogenitzar  $2 \times 10^6$  cèl.lules CT-26 amb reactiu Ultraspec a través d'una agulla estèril de calibre 21 i es va purificar el seu contingut d'ARN total amb el kit Rneasy. Mitjançant RT-PCR: (1) es va generar una població d'ARN:ADNc utilitzant hexanucleòtids com primers random i Ready-to-Go RT-PCR beads i (2) es va amplificar una sonda de 232 parells de bases marcada amb digoxigenina usant els primers NE ODC i dUTP-digoxigenina (kit PCR DIG Probe Synthesis).

L'anàlisi semiquantitatiu de mostres de cèl.lules CT-26 es va iniciar purificant l'ARNm [ARNm poli(A)<sup>+</sup>] mitjançant hibridació amb una sonda oligo(dT) marcada amb biotina i immobilització amb estreptavidina unida a partícules magnètiques (kit mRNA Isolation). Després es va marcar amb biotina l'ARNm i es va hibridar amb la sonda marcada amb digoxigenina. Per capturar l'analit una alíquota de la barreja d'hibridació es va fixar en una placa de microtitulació coberta amb estreptavidina. Finalment es va afegir un anticòs anti-digoxigenina conjugat amb peroxidasa i els complexos immunes resultants es van detectar mesurant el color produït per la reacció de la peroxidasa amb TMB a 450 nm. Per normalitzar els valors obtinguts l'ARNm ODC es va determinar l'ARNm del gen de la  $\beta$ -actina en paral·lel en cada mostra, tal i com s'especifica al kit de Northern Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Com a control negatiu es va utilitzar una sonda específica per l'ARNm del cloramfenicol acetil transferasa inclosa en el mateix kit.

### 2.2.2.8.3 ARNm-ODC per PCR a temps real

L'ARN missatger de l'ODC en biòpsies intestinals humanes es va mesurar mitjançant un mètode de PCR quantitativa amb un sistema LightCycler de Roche. (Emig *et al.* 1999, Bolufer *et al.* 2000). Es van dissenyar una parell de primers per l'ARNm-ODC (les seqüències es poden veure a l'apartat 2.1.1) utilitzant el programa OLIGO.EXE versió 3.4 a partir de la seqüència del ARNm de l'ODC humà (HSODC1) amb nombre d'accés al GenBank/EMBL X55362. L'especificitat dels primers es va comprovar amb el programa FASTA versió 3.3t07 (Pearson i Lipman 1988). Dintre del fragment amplificat de 251 parells de bases es van dissenyar dues sondes fluorescents adjacents; una marcada amb fluoresceïna (fluorocrom donador) i l'altra amb LC Red 640 (fluorocrom acceptor). Per normalitzar l'expressió de l'ARNm-ODC es van utilitzar dos controls endògens: (a) en mostres de pacients SIC es va normalitzar respecte l'expressió del gen de l'enzim glicolític gliceraldehid fosfat deshidrogenasa (GAPDH) i (b) en mostres de pacients amb càncer de còlon es va fer respecte l'ARNm d'un enzim de la ruta de síntesi d'heme, el porfobilinogen deaminasa (PBGD). Els primers i sondes per GAPDH es mostren a la **Taula 2.2**. Per detectar PBGD es va utilitzar el kit LightCycler-H-PBGD Housekeeping Gene (Roche). La quantificació de l'ARNm ODC i del gen control corresponent es feia en paral·lel en dos tubs per cada mostra.

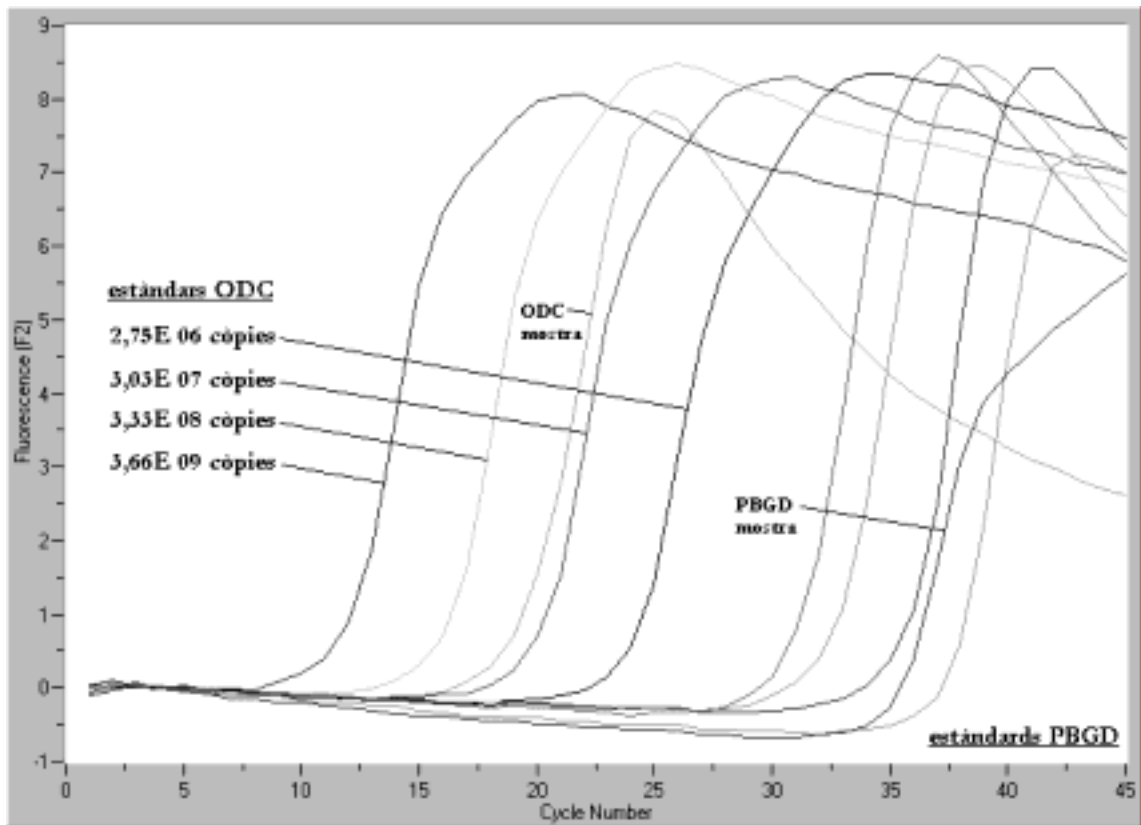
La barreja de reacció utilitzada estava formada per 4,5 µL de mostra contenint 400-500 ng d'ARN total i 1 × Light-Cycler RT-PCR reaction mix (contenint el tampó de reacció, dNTPs i MgCl<sub>2</sub>), solució de MgCl<sub>2</sub> ([MgCl<sub>2</sub>] total en la barreja de 5 mM per l'ODC i 4 mM per GAPDH), 0,2 µM de cada primer i sonda, enzim 1 × RT-PCR enzyme mix i H<sub>2</sub>O fins un volum final de 15 µL. La barreja de reacció utilitzada amb PBGD estava formada per 4,5 µL de mostra i 1 × h-PBGD Detection Mix, solució de Mn(OAc)<sub>2</sub> ([Mn(OAc)<sub>2</sub>] total en la barreja de 3,25 mM), 0,2 µM de cada primer i sonda, enzim 1 × RT-PCR enzyme mix i H<sub>2</sub>O fins un volum final de 15 µL. La transcripció inversa es va realitzar a 55°C durant 10 minuts i a continuació es va amplificar els transcrits per PCR en 45 cicles (cada cicle: 95°C durant 1 s i 57°C durant 15 s).

La quantificació es va fer a partir de la representació del senyal fluorescent emès per les sondes durant la reacció de PCR vs. el nombre de cicle de PCR (**Figura 2.38**). El rang de linealitat del mètode anava de 10<sup>4</sup> fins a 10<sup>10</sup> còpies d'ARNm ODC. La variable analítica d'aquest mètode es el punt de tall (C<sub>p</sub>; [angl.] *crossing point*) el qual es defineix com el primer cicle de PCR on es detecta un augment significatiu del senyal fluorescent per sobre de la fluorescència de fons. El seu valor és funció inversa de la quantitat inicial de còpies d'ARNm diana presents a la reacció. Així doncs, l'expressió de l'ARN missatger de la ODC relativa al gen del GAPDH es va calcular a partir de la fórmula:

$$\text{Nombre relatiu de còpies d'ODC} = 2^{-[C_p(\text{ODC}) - C_p(\text{GADPH})]}$$

Mentre que l'expressió respecte PBGD es va calcular a partir de:

$$\text{Nombre relatiu de còpies d'ODC} = (-3,68C_p(\text{ODC}) + 45,64) / (-2,72C_p(\text{PBGD}) + 46,53)$$



**Figura 2.38** Representació de la fluorescència emesa per nombre de cicle de PCR en analitzar conjuntament dilucions estàndards d'ornitina decarboxilasa (ODC) i de porfobilinogen deaminasa (PBGD), i una mostra de càncer colorectal.

### ***2.2.2.9 ARN missatger de l'antiènzim***

L'ARN total es va extreure de mostres d'intestí humà pel mètode de Chomczynski i Sacchi (1987) utilitzant el kit RNeasy. L'ARN purificat es va fraccionar en gel d'agarosa a l'1 % amb formaldehid i es va transferir amb un col·lector de buit a una membrana de niló Hybond N+. Es va sintetitzar una sonda per a l'AZ en un procediment en dues passes: (a) amplificant per RT-PCR un fragment d'ARNm AZ de 643 parells de bases a partir de tres mostres intestinals diferents, barrejant els productes i (b) marcant radioactivament l'ADN complementari obtingut amb  $^{32}\text{P}$  mitjançant el kit Megaprime Random Labeling. Les membranes es van hibridar amb les sondes durant 20 hores en un forn d'hibridació. El senyal emès per la membrana es va recollir en una pel·lícula d'autoradiografia per exposició durant 48 hores.

### 2.2.2.10 Proteïna de l'antienzim

Per intentar detectar la proteïna de l'antienzim en mostres de budell humà es va utilitzar un AZ de ratolí. Tenint en compte l'homologia de les proteïnes AZ murina i humana (**Figura 2.39**) i en absència d'un anticòs anti-AZ humà disponible es va explorar la possibilitat d'usar aquesta anticòs per anàlisi Western Blot i ELISA. L'anticòs anti-AZr havia estat originat per immunització d'un conill amb la proteïna recombinat de l'AZ murí

---

#### BLASTP 2.2.3

```
Score = 336 bits (862), Expect = 9e-92
Identities = 166/217 (76%), Positives = 179/217 (81%)

AZh: 1  MVKSSLQRILNSHCFAREKEGDKPSATIHASRTMPXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXNP 60
      MVKSSLQRILNSHCFAREKEGDK SAT+HASRTMP N
AZr: 1  MVKSSLQRILNSHCFAREKEGDKRSATLHASRTMPLLSQHSRGGCSSESSRVALNCCSNL 60

AZh: 61  GPGPRWCSDAPHPPLKIPGGRGNSQRDHNLSANLFYSDDRLNVTEELTSNDKTRILNVQS 120
      GPGPRWCSD PPHPPLKIPGGRGNSQRDH+LSA++ YSD+RLNVTEE TSNDKTR+L++QS
AZr: 61  GPGPRWCSDVPHPPPLKIPGGRGNSQRDHSLSASILYSDERLNVTEEPTSNDKTRVLSIQS 120

AZh: 121 RLTDAKRINWRTVLSGGSLYIEIPGGALPEGSKDSFAVLLEFAEEQLRADHVFICFHKNR 180
      LT+AK++ WR V SGG LYIE+P G LPEGSKDSFA LLEFAEEQL+ADHVFICF KNR
AZr: 121 TLTEAKQVTWRAVWSGGGLYIELPAGPLPEGSKDSFAALLEFAEEQLQADHVFICFPKNR 180

AZh: 181 EDRAALLRTFSFLGFIVRPGHPLVPKRPDACFMAYT 217
      EDRAALLRTFSFLGFIVRPGHPLVPKRPDACFM YT
AZr: 181 EDRAALLRTFSFLGFIVRPGHPLVPKRPDACFMVYT 217
```

---

**Figura 2.39** Comparació de les seqüències d'aminoàcids de l'antienzim humà (AZh, [Homo Sapiens], GenBank/EMBL: NP\_004143) i l'antienzim de ratolí (AZr, [Mus musculus], GenBank/EMBL NP\_032779). Amb fons negre s'assenyalen els residus idèntics, mentre que el signe + apareix entre els residus similars.

expressada en *E. coli* (Gritli-Linde *et al.* 2001). La fracció IgG de l'antiserum d'un dels conills immunitzats es va utilitzar finalment per optimitzar el mètode (veure resultats). Per eliminar els anticossos que reaccionaven amb antigens inespecífics presents en les cèl·lules humanes, l'antisèrum es va tractar amb un extracte sòlid de cèl·lules K-562 deplecionades d'AZ (exposades a DFMO 20mM i precipitades amb acetona (Sambrook *et al.* 1989)), en gel durant 15 min. La suspensió generada es va clarificar a 10.000 × g, 10 min i el sobrenedant es va conservar a -20 °C. Una dilució 1:3000 d'aquest sobrenedant va constituir la solució de treball en experiments posteriors.

Inicialment, es va estudiar *in vitro* la interacció anticòs-antigen en cultius de cèl·lules humanes. Cèl·lules proliferants K-562 i Caco-2 es van tractar amb putrescina 10 mM durant 18 hores o amb DFMO 20 mM durant 24 h. Les cèl·lules es van recollir per centrifugació, es van rentar amb PBS i es van diluir en 200 µL de tampó de lisi (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet-40 1% i una pastilla de cocktail inhibidor de proteases Mini/10 mL tampó, a pH = 8,0). Les mostres intestinals humanes polvoritzades es van homogenitzar en tampó de lisi en una proporció aproximada de 1 mg teixit/10 µL tampó. Els lisats cel·lulars i els homogeneïtzats de teixit es van sonicar (3 cicles × 3 s) i clarificar per centrifugació a 12.000 × g, 2 min, 4°C. Els sobrenedants es van utilitzar per analitzar l'expressió de l'antienzim: es va determinar la concentració de proteïnes



als sobrenedants i alíquotes contenint 30 µg de proteïna total es van incubar a 100 °C, 3 min en SDS 2% i DTT 100mM, i es van fraccionar per electroforesi a través d'un gel de poliacrilamida al 12 % amb 0,1% SDS. Les proteïnes es van transferir a membranes de diflorur de polivinilidè (PVDF) per electrodeposició durant 1 hora a 4°C en una cubeta Transfer Blot-Cell utilitzant Tris base 50 mM, glicina 39 mM, SDS 0,04 % i metanol 20%. Les membranes de PVDF es van bloquejar amb PBS-T (solució salina tamponada amb fosfat pH = 7,4 i Tween-20 al 0,05%) contenint un 10% de llet descremada comercial en pols i seguidament es van incubar amb la solució de treball de l'anti-AZ. Finalment, les membranes s'incubaven amb un anticòs anti-IgG de conill (dilució 1:5.000) conjugat amb peroxidasa durant 1 h i els complexos immunes es detectaven amb els substrats quimioluminiscent ECL Plus o SuperSignal West Femto.

### **2.2.2.11 Proteïna de la ciclina D1**

Biòpsies intestinals humanes pulveritzades es van homogenitzar en tampó de lisi (Tris-HCl 50mM, NaCl 150 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02 %, NP-40 1% i fluorur de fenilsulfonilmetil 1mM, pH = 8,0), es van sonicar i centrifugar a 20.000 × g, 20 min. Les proteïnes dels sobrenedants es van resoldre en un gel de poliacrilamida-SDS al 15 % i es van transferir a membranes de PVDF. Després de bloquejar amb una solució de llet descremada comercial 5% en PBS-T durant 45 min, les membranes es van incubar durant una nit a 4 °C amb un anticòs monoclonal anti-ciclina D1 humana diluït 1:1.000 en la mateixa solució de bloqueig. La detecció de l'anticòs primari es va dur a terme amb un anticòs anti-ratolí conjugat amb peroxidasa. El substrat quimioluminiscent ECL Plus seguit d'autoradiografia es va utilitzar per observar l'expressió relativa de la proteïna.

### **2.2.2.12 Expressió i purificació de proteïnes recombinants AZI**

Mitjançant mutagènesi dirigida *in vitro*, utilitzant mètodes previament descrits (Nilsson *et al.* 2000), es van generar plàsmids contenint les mutacions A88D, S274R i A88D/S274R en l'inhibidor de l'antienzim (AZI) per estudis d'activitat ornitina descaboxilasa. Breument, la seqüència codificant de l'AZI de ratolí es va amplificar per PCR amb oligonucleòtids específics pel gen contenint dianes de restricció *NdeI*. Els productes de PCR es van subclonar en el vector pET-19b (via amplificació en pGEM-T) mitjançant digestió amb *NdeI*. El kit Gene-Editor Site-directed mutagènesi es va utilitzar per introduir les mutacions mencionades en el constructe pET-AZI amb un oligo amb la mutació A88D, un oligo amb la mutació S274R o ambdós oligos en la reacció de mutagènesi. Els oligos emprats van ser (el codó afectat es mostra subratllat): 5'-ggAACTgggTTTgATTgTTCCAgCAAA-3' (gCT->gAT) per la mutació A88D i 5'-TCAgAACCTggAAgATACTATgTATCT-3' (AgC->AgA) per la mutació S274R. La presència de les mutacions es va confirmar mitjançant seqüenciació d'ADN en un seqüenciador ABI Prism 310 utilitzant el kit Big Dye Terminator. Uns plàsmids contenint les regions codificants de l'ODC humana i l'AZI de ratolí (pET-ODC i pET-AZI), generats en experiments anteriors (Nilsson *et al.* 2000), es van utilitzar com a control positiu i control negatiu, respectivament, d'activitat ornitina descarboxilasa.

Amb els cinc plàsmids es van transformar cèl·lules competents d'*Escherichia coli* JM109 i es van sembrar en plaques amb medi Luria-Bertoni (LB) contenint carbencilina/isopropiltio- $\beta$ -D-galactòsid (IPTG)/X-gal. De les plaques cultivades a 37°C durant la nit, es va seleccionar un transformant sense activitat  $\beta$ -galactosidasa contenint l'insert corresponent, i es va cultivar durant la nit en 2 mL de LB amb carbencilina 50  $\mu$ g/mL (Cb50). Aquest volum es va inocular en 500 mL de LB-Cb50, el cultiu es va incubar a 37°C fins a  $D_{600} = 0,6-0,7$ , llavors es va induir l'expressió de la proteïna recombinant amb una concentració final d'IPTG 1mM durant 3-5 h a 30°C. Els bacteris es van recollir a 5000 $\times$ g, 5 min, assecar i conservar a -20°C.

El vector pET-19b contenia una seqüència codificant per sis histidines de manera que tots els inserts introduïts a 3' formaven una proteïna de fusió -(His)<sub>6</sub> quan s'expressaven en bacteris. Per purificar les proteïnes recombinants es van utilitzar columnes carregades amb níquel (Ni<sup>2+</sup>) en condicions natives per preservar l'activitat ODC. Inicialment, es va treballar amb columnes Ni-NTA (Qiagen) resuspenent el sediment bacterià en tampó de lisi (format per lisozim 1 mg/mL i 0,1 mM PMSF sobre la base del tampó de rentat de les columnes: Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH = 8; NaCl 300 mM; imidazol 20 mM, glicerol), sonicant i centrifugant a 10.000  $\times$  g, 15 min. El lisat es va carregar en columnes preequilibrades, es va rentar amb el tampó de rentat i es va eluir amb tampó d'elució imidazol 250 mM. Posteriorment, es va treballar amb un sistema cromatogràfic Econo (Biorad) equipat amb un espectrofotòmetre i columnes d'afinitat HiTrap (Amersham Pharmacia) amb els mateixos tampons anteriors però amb NaCl 500 mM. Els valors de l'absorvència a 280 nm del líquid eluït es van utilitzar per recollir-lo en diferents fraccions. Aquestes es van estudiar per resolució en gels de poliacrilamida-SDS 8% i tinció amb Coomassie Brilliant Blue G-250, i per determinació de l'activitat ODC pel mètode del <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>.

### **2.2.2.13 Proteïna total**

La concentració de la proteïna soluble total als sobrenedants de totes les mostres es va determinar pel mètode de l'àcid bicinconínic amb el kit BCA Protein Assay de Pierce (Smith et al. 1985).

### **2.2.2.14 Anàlisi estadística de dades experimentals**

Les dades experimentals es van emmagatzemar i tractar en arxius de Microsoft Excel 97. Per al processament estadístic es va utilitzar el programa SPSS versió 8.0. Amb aquest programa es van realitzar els controls de qualitat dels mètodes utilitzats, estudis descriptius de les variables analitzades i es van aplicar diferents proves estadístiques. En totes les proves d'inferència estadística es va considerar significatiu un valor de  $p < 0,05$ . Quan no apareix indicat un altre valor de l'estadístic  $p$ , s'assumeix aquest valor com a sinònim de significació.



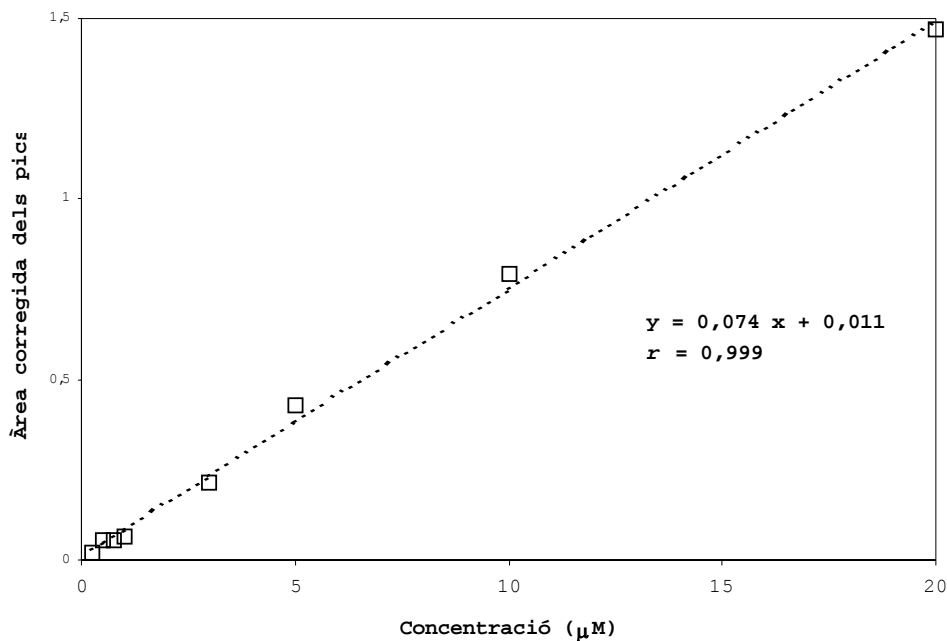
# 3 Resultats

## 3 Resultats

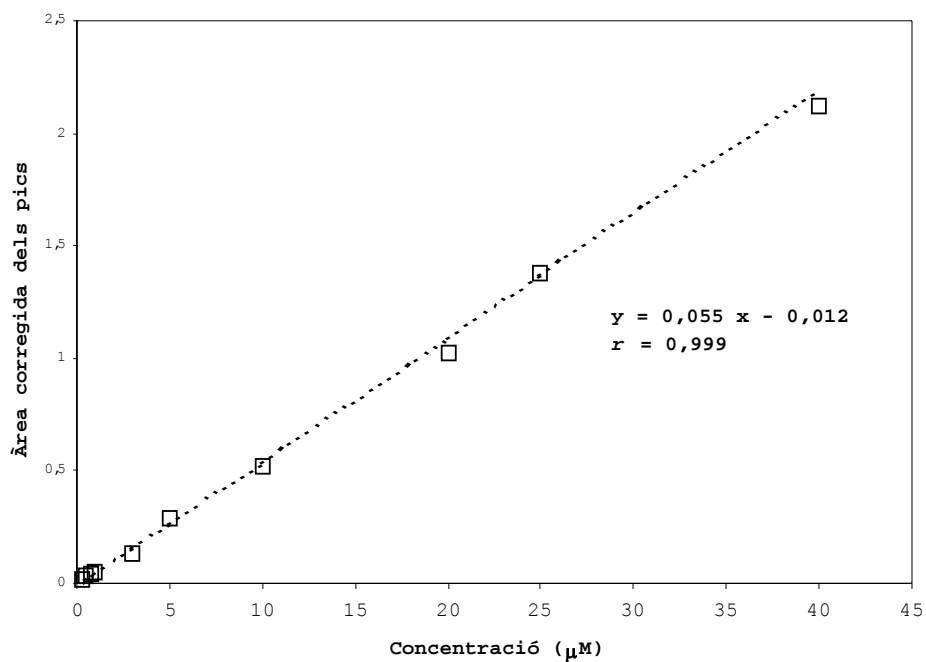
### 3.0 Control de qualitat del mètode de quantificació de poliamines

#### 3.0.1 Linealitat i corbes de calibratge

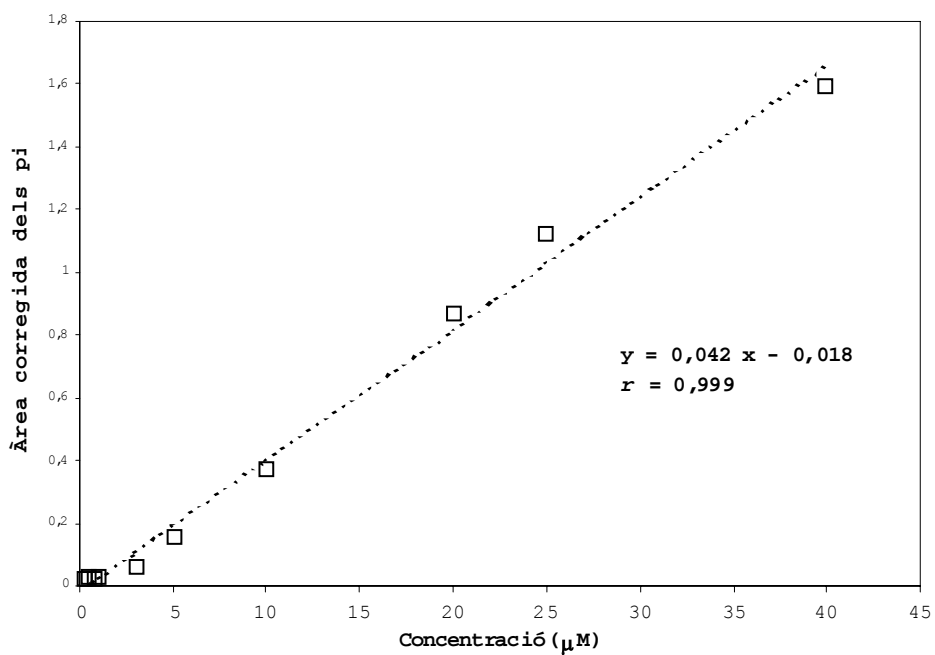
La linealitat del mètode es va comprovar mitjançant l'ús de corbes de calibratge. Les corbes es van calcular fent servir solucions estàndard per pesada de les poliamines en aigua com a calibradors amb concentracions dintre del rang 0,25 - 40  $\mu\text{M}$ . L'anàlisi de cadascuna d'aquestes solucions estàndard es va fer per sextuplicat fent servir el gradient que apareix a la **Taula 2.19**. A continuació, es van construir les corbes de calibratge entre la resposta observada ( $A_{\text{pic}}/A_{\text{estàndard intern}}$ ) i les concentracions de cadascuna de les poliamines. A les **Figures 3.1, 3.2 i 3.3** es mostren les corbes de calibratge corresponents a la putrescina, l'espermidina i l'espermina.



**Figura 3.1** Corba de calibratge del mètode d'HPLC per a la putrescina.



**Figura 3.2** Corba de calibratge del mètode d'HPLC per a l'espermidina.



**Figura 3.3** Corba de calibratge del mètode d'HPLC per a l'espermina.

### 3.0.2 Significació dels coeficients de correlació i de determinació

Vam estudiar la significació estadística dels coeficients de correlació de les corbes de calibratge mitjançant el test de Spearman. Seguidament, vam calcular els coeficients de determinació ( $r^2$ ) per conèixer quina proporció de la variància total de la variable resposta es pot explicar pel model lineal de regressió. Els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 3.1**.

**Taula 3.1** Coeficients de correlació, grau de significació i coeficients de determinació de les corbes de calibratge de les poliamines.

	$r$	$P$	$r^2$ (%)
Putrescina	0,9985	< 0,001	99,70
Espermidina	0,9995	< 0,001	99,90
Espermina	0,9994	< 0,001	99,88

Es pot observar, que tots els valors de  $r$  obtinguts suposen una correlació positiva, amb una probabilitat superior al 99,9%. Respecte als  $r^2$  trobats, en tots els casos la variable independent (concentració) explica de mitjana, el 99,83% de la variància total de  $y$  (resposta).

### 3.0.3 Precisió

Per a estudiar la precisió del mètode es van realitzar sis determinacions en dues mostres de sang diferents (A i B), i sis més en dues mostres de cultiu de cèl.lules Caco-2 (C i D). Totes les mostres van presentar diferents nivells de PA. A les mostres de sang no es va detectar la presència de putrescina. L'anàlisi de les mostres es va dur a terme en una única sessió de cromatografia amb el sistema descrit a l'apartat 2.1.1 i amb un únic lot de rectius i solvents. Els resultats obtinguts per a cada poliamina en forma de mitjana, desviació estàndard i coeficient de variació es mostren a les **Taules 3.2, 3.3 i 3.4**.

**Taula 3.2** Precisió del mètode en la determinació de la putrescina (n = 6)

	Contingut ( $\mu\text{M}$ )			
	Mostra A	Mostra B	Mostra C	Mostra D
Mitjana	—	—	0,68	0,81
Desviació típica	—	—	0,03	0,03
C.V. %	—	—	3,96	4,01

Mostres: A i B sang; C i D cèl.lules Caco-2.

**Taula 3.3 Precisió del mètode en la determinació de l'espermidina (n = 6)**

	Contingut ( $\mu\text{M}$ )			
	Mostra A	Mostra B	Mostra C	Mostra D
Mitjana	22,74	21,38	2,02	2,36
Desviació típica	0,33	0,68	0,05	0,07
C.V. %	1,46	3,18	2,54	2,82

Mostres: A i B sang; C i D cèl.lules Caco-2.

**Taula 3.4 Precisió del mètode per a la determinació de l'espermina (n = 6)**

	Contingut ( $\mu\text{M}$ )			
	Mostra A	Mostra B	Mostra C	Mostra D
Mitjana	7,64	17,14	2,05	3,12
Desviació típica	0,20	0,55	0,10	0,16
C.V. %	2,62	3,22	4,87	5,12

Mostres: A i B sang; C i D cèl.lules Caco-2.

### 3.0.4 Exactitud

L'exactitud del mètode cromatogràfic es va calcular per addició de solucions estàndards 10  $\mu\text{M}$  de les tres poliamines a alíquotes d'una mostra de sang i una mostra de cèl.lules CT-26. Després, es van comparar els valors obtinguts amb els de la mostra corresponent sense addició. Les addicions es van fer després del trencament de les cèl.lules (primera passa on es disposa d'una solució de poliamines lliures). Es van fer sis determinacions analítiques per cada mostra. Els resultats es mostren a la **Taula 3.5**.

**Taula 3.5 Recuperació de les poliamines en mostres de sang i de cèl.lules CT-26 (n = 6)**

	Recuperació (%)	
	Sang	CT-26
Putrescina	88,2 $\pm$ 5,1	86,5 $\pm$ 5,8
Espermidina	94,5 $\pm$ 2,3	92,5 $\pm$ 3,1
Espermina	92,0 $\pm$ 4,4	88,1 $\pm$ 3,9
Estàndard intern	102,5 $\pm$ 2,6	100,2 $\pm$ 3,0

### 3.0.5 Sensibilitat

El límit de detecció (LD) del mètode analític es defineix com la concentració o quantitat d'analit més petita detectable amb una certesa raonable. En els procediments cromatogràfics no existeix un correcció de la lectura front un blanc i per calcular el límit de detecció es va fer servir l'expressió:

$$LD = \frac{y_{bl} + 3s_{bl}}{b}$$

on  $b$  es el pendent de la corba inversa de calibratge, i  $y_{bl}$  i  $s_{bl}$  són la mitjana i la desviació típica, respectivament, en la resposta de  $n$  blancs.

El límit de quantificació (LQ) o de determinació es defineix com la concentració o quantitat més petita d'analit en la mostra que es pot determinar amb precisió i exactitud acceptables. En aquest cas vam fa servir la fórmula:

$$LQ = \frac{y_{bl} + 10s_{bl}}{b}$$

Per calcular ambdós paràmetres, vam obtenir un blanc de mostra amb tots els components de les cèl·lules excepte les poliamines. Vam acidificar una alíquota de cèl·lules en condicions oxidants a un pH de 0, durant 24 h i vam analitzar la intensitat de fluorescència als  $t_R$  de cada PA en la seva absència.

**Taula 3.6 Intensitats de fluorescència de les poliamines en un blanc d'hidròlisi**

	Mitjana $\pm$ D.T. (n=6)
Putrescina	2,8 $\pm$ 0,06
Espermidina	3,4 $\pm$ 0,06
Espermina	5,2 $\pm$ 0,21

Amb aquestes dades i les corbes inverses de calibratge,

Putrescina:	$y = 13,42 x - 0,139$
Espermidina:	$y = 18,11 x + 0,220$
Espermina:	$y = 23,70 x + 0,507$



s'obtenen els límits de detecció i quantificació del mètode:

**Taula 3.7 Límits de detecció i de quantificació del mètode per la determinació de poliamines**

	LD ( $\mu\text{M}$ )	LQ ( $\mu\text{M}$ )
Putrescina	0,20	0,25
Espermidina	0,20	0,25
Espermina	0,25	0,35

## 3.1 Poliamines en la sang

### 3.1.1 Establiment d'uns valors de referència de les poliamines en sang

L'estadística descriptiva de les variables quantitatives estudiades en el grup de 66 subjectes sans on es van mesurar les concentracions intraeritrocitàries d'espermidina i espermina es mostra en la **Taula 3.8**.

**Taula 3.8 Estadística descriptiva de les poliamines i dels paràmetres eritrocitaris en un grup de població normal (n = 66).**

Variable	Mitjana	Mínim	Màxim	Rang	DT	Error típic	Variança	Curtosi	Asimetria
Edat	37,29	18	75	57	13,38	1,65	179	-0,61	0,37
Poliamines									
Espermidina <sup>1</sup>	20,42	9,57	34,20	24,63	5,34	0,66	28,47	0,35	0,64
Espermina <sup>1</sup>	15,32	4,69	37,61	32,92	8,78	1,08	77,08	-0,18	0,87
EPD/EPM	1,71	0,51	3,94	3,43	0,81	0,10	0,65	-0,58	0,45
Paràmetres eritrocitaris									
Eritròcits <sup>2</sup>	4,6	3,8	5,5	1,7	0,42	0,05	0,17	-0,84	-0,03
Hemoglobina <sup>3</sup>	14,0	11,0	16,5	5,5	1,25	0,16	1,56	-0,59	-0,25
Hematòcrit	42,0	32,6	50,1	17,5	3,88	0,49	15,06	-0,54	-0,21
VCM <sup>4</sup>	90,7	83,2	102,5	19,3	4,09	0,52	16,72	-0,19	0,27
HGBCM <sup>5</sup>	30,15	27,1	33,5	6,4	2,18	0,19	2,18	-0,70	-0,04
CHBGC <sup>6</sup>	33,21	32,0	35,0	3,0	0,76	0,1	0,57	-0,44	0,40
DVH <sup>7</sup>	12,8	11,6	14,9	3,3	0,73	0,1	0,53	0,80	0,85

<sup>1</sup> [nmol/10E(12) eritròcits]; <sup>2</sup> [10E(12)/L]; <sup>3</sup> [g/dL]; <sup>4</sup> Volum corpuscular mitjà [fL]; <sup>5</sup> Hemoglobina corpuscular mitjana [pg]; <sup>6</sup> Concentració d'HGBCM [g/dL]; <sup>7</sup> Distribució del volum d'hematòcrit (%).

#### 3.1.1.1 Partició dels valors de referència

Vam estudiar els valors d'espermidina, d'espermina i del seu quocient EPD/EPM, dividits en diferents subclasses (edat, sexe i tabaquisme) per veure si aquestes tenien diferents desviacions típiques i diferents mitjanes. Els tests estadístics emprats van ser la prova de Levene i la prova t de Student, respectivament (**Taules 3.9, 3.10 i 3.11**). En cap cas es va poder rebutjar la hipòtesi nul·la d'igual distribució, en conseqüència, es va considerar

innecessària la partició dels valors de referència i es va assumir una distribució de referència homogènia per a les tres variables.

**Taula 3.9 Distribució de l'espermidina, l'espermina i EPD/EPM en la població de referència estratificada en la subclasse edat.**

Prova t per mostres independents d'EDAT						
Variable	n	Mitjana	DT	ETM		
<b>Espermidina</b>						
EDAT >= 40,	31	21,7218	5,460	,981		
EDAT < 40,	35	19,2660	5,020	,849		
Diferència de les mitjanes = 2,4558						
Prova de Levene per la igualtat de les variàncies: F= ,738 <b>P= ,394</b>						
Prova t per la igualtat de les mitjanes						
Variàncies	Valor t	df	Significació	ET	Diferència	IC 95%
Igual	1,90	64	<b>,061</b>	1,290	(-,122; 5,034)	
Desigual	1,89	61,38	<b>,063</b>	1,297	(-,138; 5,050)	
Espermina						
EDAT >= 40,	31	16,9977	9,447	1,697		
EDAT < 40,	35	13,8251	7,984	1,350		
Diferència de les mitjanes = 3,1725						
Prova de Levene per la igualtat de les variàncies: F= 2,306 <b>P= ,134</b>						
Prova t per la igualtat de les mitjanes						
Variàncies	Valor t	df	Significació	ET	Diferència	IC 95%
Igual	1,48	64	<b>,144</b>	2,146	(-1,115; 7,460)	
Desigual	1,46	59,10	<b>,149</b>	2,168	(-1,167; 7,512)	
EPD/EPM						
EDAT >= 40,	31	1,6455	,799	,144		
EDAT < 40,	35	1,7595	,822	,139		
Diferència de les mitjanes = -,1140						
Prova de Levene per la igualtat de les variàncies: F= ,004 <b>P= ,950</b>						
Prova t per la igualtat de les mitjanes						
Variàncies	Valor t	df	Significació	ET	Diferència	IC 95%
Igual	-,57	64	<b>,571</b>	,200	(-,514; ,286)	
Desigual	-,57	63,43	<b>,570</b>	,200	(-,513; ,285)	

**Taula 3.10 Distribució de l'espermidina, l'espermina i EPD/EPM en la població de referència estratificada en la subclasse sexe.**

Prova t per mostres independents de **SEXE**

Variable	n	Mitjana	DT	ETM
<b>Espermidina</b>				
home	35	20,3626	5,555	,939
dona	31	20,4836	5,167	,928

Diferència de les mitjanes = -,1210

Prova de Levene per la igualtat de les variàncies: F= ,002 **P= ,965**

Prova t per la igualtat de les mitjanes

Variàncies	Valor t	df	Significació	ET	Diferència	IC	95%
Igual	-,09	64	<b>,928</b>	1,326		(-2,771; 2,529)	
Desigual	-,09	63,84	<b>,927</b>	1,320		(-2,759; 2,517)	

Variable	n	Mitjana	DT	ETM
<b>Espermina</b>				
home	35	14,7768	7,745	1,309
dona	31	15,9232	9,914	1,781

Diferència de les mitjanes = -1,1465

Prova de Levene per la igualtat de les variàncies: F= 2,641 **P= ,109**

Prova t per la igualtat de les mitjanes

Variàncies	Valor t	df	Significació	ET	Diferència	IC	95%
Igual	-,53	64	<b>,600</b>	2,177		(-5,497; 3,205)	
Desigual	-,52	56,61	<b>,606</b>	2,210		(-5,573; 3,280)	

Variable	n	Mitjana	DT	ETM
<b>EPD/EPM</b>				
home	35	1,6621	,695	,117
dona	31	1,7555	,928	,167

Diferència de les mitjanes = -,0934

Prova de Levene per la igualtat de les variàncies: F= 3,640 **P= ,061**

Prova t per la igualtat de les mitjanes

Variàncies	Valor t	df	Significació	ET	Diferència	IC	95%
Igual	-,47	64	<b>,643</b>	,200		(-,494; ,307)	
Desigual	-,46	55,18	<b>,649</b>	,204		(-,502; ,315)	

**Taula 3.11 Distribució de l'espermidina, l'espermina i EPD/EPM en la població de referència estratificada en la subclasse tabaquisme.**

Prova t per mostres independents de **TABAQUISME**

Variable	n	Mitjana	DT	ETM
<b>Espermidina</b>				
fumador	19	19,4809	5,160	1,216
no fumador	47	20,8379	5,449	,795

Diferència de les mitjanes = -1,3570

Prova de Levene per la igualtat de les variàncies: F= ,445 **P= ,507**

Prova t per la igualtat de les mitjanes

Variàncies	Valor t	df	Significació	ET Diferència	IC 95%
Igual	-,91	63	<b>,366</b>	1,489	(-4,334; 1,620)
Desigual	-,93	32,44	<b>,357</b>	1,453	(-4,317; 1,603)

Variable	n	Mitjana	DT	ETM
<b>Espermina</b>				
fumador	19	13,4643	7,840	1,848
no fumador	47	15,8924	9,148	1,334

Diferència de les mitjanes = -2,4281

Prova de Levene per la igualtat de les variàncies: F= 1,305 **P= ,258**

Prova t per la igualtat de les mitjanes

Variàncies	Valor t	df	Significació	ET Diferència	IC 95%
Igual	-,99	63	<b>,324</b>	2,443	(-7,311; 2,455)
Desigual	-1,07	35,76	<b>,294</b>	2,279	(-7,052; 2,196)

Variable	n	Mitjana	DT	ETM
<b>EPD/EPM</b>				
fumador	19	1,8026	,747	,176
no fumador	47	1,6878	,833	,122

Diferència de les mitjanes = ,1148

Prova de Levene per la igualtat de les variàncies: F= ,672 **P= ,415**

Prova t per la igualtat de les mitjanes

Variàncies	Valor t	df	Significació	ET Diferència	IC 95%
Igual	,51	63	<b>,611</b>	,225	(-,334; ,564)
Desigual	,54	34,18	<b>,595</b>	,214	(-,320; ,550)

### 3.1.1.2 Poliamines totals en sang

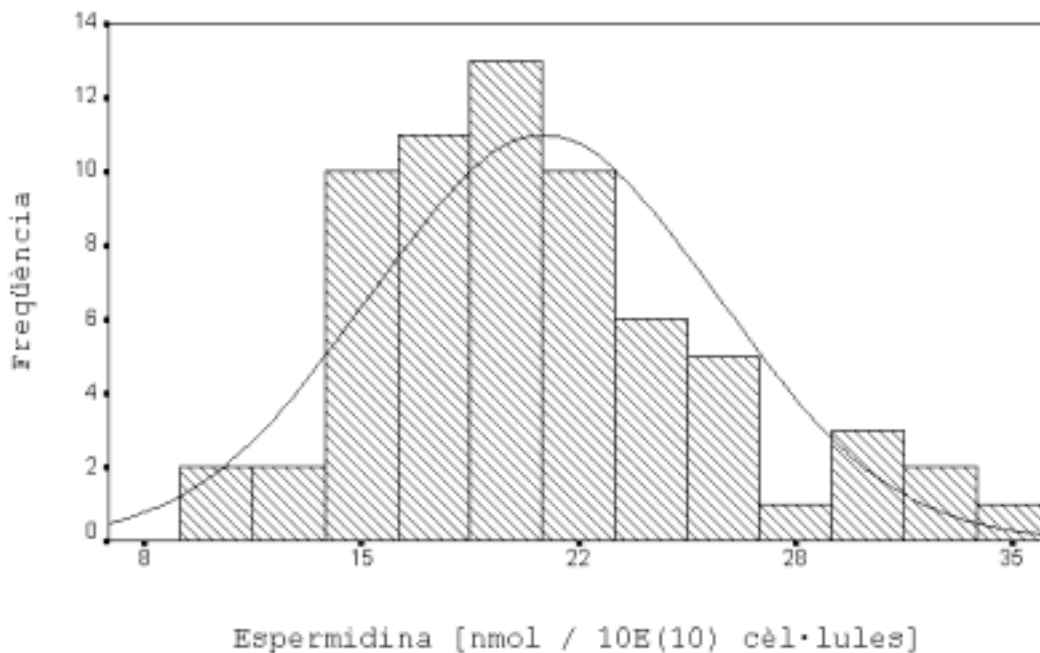
Puix que dones i homes tenen diferent quantitat d'eritròcits per L de sang, vam comprovar si existien diferències en el total de poliamina en sang (eritròcits/L sang multiplicat per nmol PA/nombre d'eritròcits) entre els sexes, mitjançant la prova t de Student. Com es pot observar a la **Taula 3.12**, homes i dones tenen la mateixa quantitat de poliamines totals en sang.

**Taula 3.12 Distribució del total d'espermidina i d'espermina en sang en la població de referència estratificada en la subclasse sexe.**

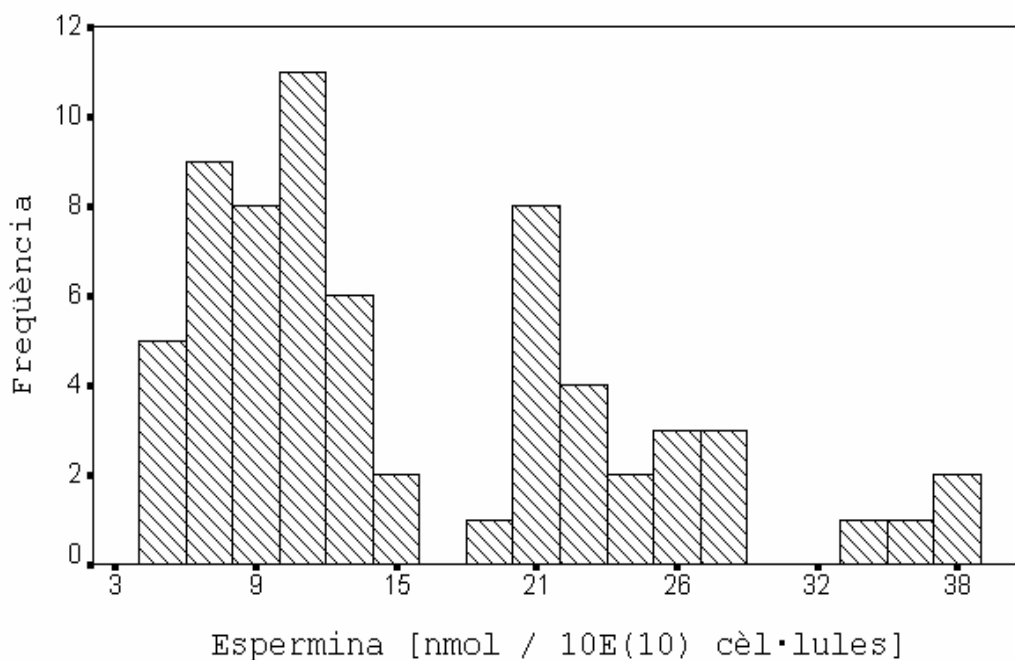
Prova t per mostres independents de <b>SEXE</b>						
Variable	n	Mitjana	DT	ETM		
<b>Espermidina total</b>						
dona	31	2048,3644	516,688	92,800		
home	35	2036,2612	555,511	93,898		
Diferència de les mitjanes = 12,1032						
Prova de Levene per la igualtat de les variàncies: F= ,002 P= ,965						
Prova t per la igualtat de les mitjanes						
Variàncies	Valor t	df	Significació	ET Diferència	IC	95%
Igual	,09	64	,928	132,607	(-252,870;	277,076)
Desigual	,09	63,84	,927	132,018	(-251,693;	275,899)
Prova t per mostres independents de <b>SEXE</b>						
Variable	n	Mitjana	DT	ETM		
<b>Espermina total</b>						
dona	31	1592,3226	991,444	178,069		
home	35	1477,6761	774,539	130,921		
Diferència de les mitjanes = 114,6465						
Prova de Levene per la igualtat de les variàncies: F= 2,641 P= ,109						
Prova t per la igualtat de les mitjanes						
Variàncies	Valor t	df	Significació	ET Diferència	IC	95%
Igual	,53	64	,600	217,749	(-320,455;	549,748)
Desigual	,52	56,61	,606	221,018	(-328,034;	557,327)

### 3.1.1.3 Inspecció de la distribució dels valors de poliamines en sang

En primer lloc, vam estudiar visualment la distribució de les poliamines mitjançant la representació gràfica en histogrames. Com es pot veure a la **Figura 3.4**, l'espermidina mostra una distribució gaussiana amb una cua dreta més llarga i sense cap valor atípic.

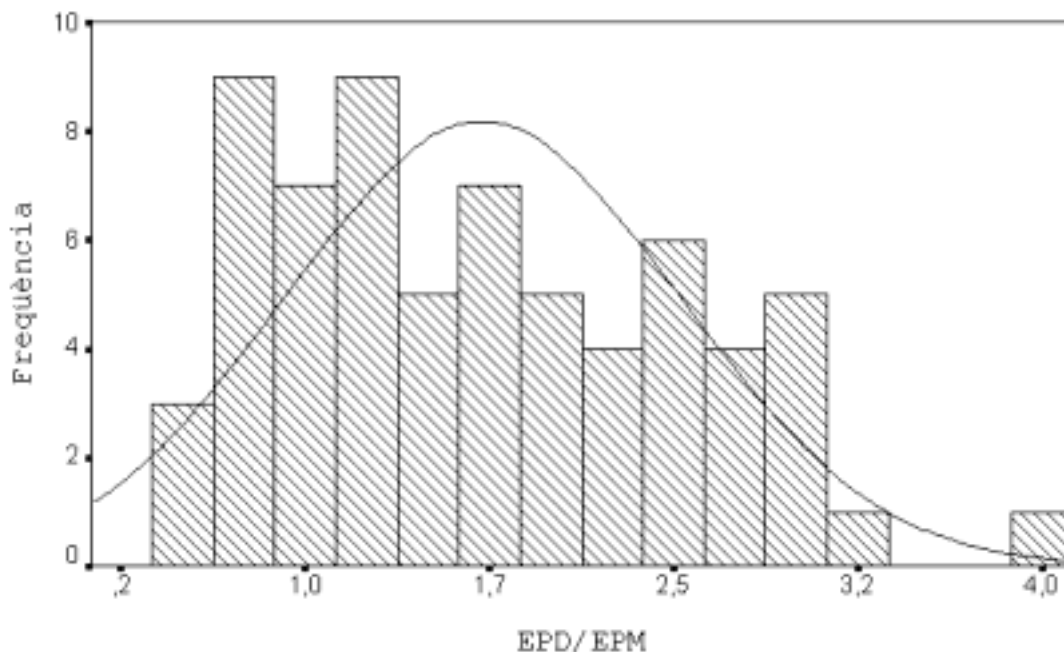


**Figura 3.4** Distribució de l'espermidina en la població normal.



**Figura 3.5** Distribució de l'espermina en la població normal.

En canvi, l'espermina mostra una distribució bimodal amb dos màxims al voltant de 10 i 25 nmol / 10<sup>10</sup> cèl.lules (**Figura 3.5**).



**Figura 3.6** Distribució de la relació EPD/EPM en la població normal.

L'EPD/EPM podria presentar una distribució continua o bé una distribució gaussiana amb un potencial valor atípic a l'esquerra. (**Figura 3.6**).

Donat que les tres variables presenten una distribució amb un biaix positiu, es van inspeccionar els histogrames dels logaritmes neperians de les variables (no es mostren) per identificar possibles valors atípics. En el cas de l'espermidina aquesta representació va mostrar dos valors aïllats corresponents a 9,57 i 10,52 nmol / 10<sup>10</sup> cèl.lules. En el cas de l'espermina la representació logarítmica no va mostrar potencials valors atípics però va reforçar la hipòtesi d'una distribució bimodal. A l'histograma de Ln (EPD/EPM) el valor corresponent a 3,94 apareix aïllat de la resta.

#### *Identificació de valors atípics*

En aplicar el test del rang als valors extrems de les poliamines cap d'ells va resultar ser un valor atípic.



### 3.1.1.4 Establiment dels valors de referència

En primer lloc, vam comprovar la bondat de l'ajust de la distribució de les dades de l'espermidina, l'espermina i el quocient EPD/EPM a una distribució gaussiana (**Taula 3.13**).

**Taula 3.13 Prova de Kolmogorov-Smirnov per les PA en sang de població normal**

Variable	Diferències més extremes			Z	P
	Absoluta	Positiva	Negativa		
Espermidina	0,08352	0,08352	-0,05058	0,6785	0,7466
Espermina	0,19933	0,19933	-0,11301	1,6193	0,0106
EPD/EPM	0,10394	0,10394	-0,06875	0,8444	0,4739

Per l'espermidina i l'EPD/EPM, la prova de Kolmogorov-Smirnov no va rebutjar la hipòtesi gaussiana i es va procedir directament a l'estimació paramètrica dels percentils. En canvi, per l'espermina aquesta hipòtesi va quedar rebutjada. Quan es van comparar les mitjanes de dos grups d'individus agrupats com inferiors o superiors a un valor de tall arbitrari 19 nmol espermina /  $10^{10}$  cèl.lules es va obtenir una diferència significativa, confirmant el caràcter bimodal del grup. De totes formes, vam procedir a aplicar una transformació matemàtica de les dades d'espermina per aproximar-les a una distribució gaussiana.

#### *Transformació de les dades de l'espermina*

La transformació logarítmica dels valors de l'espermina si que es va ajustar a una distribució gaussiana (**Taula 3.14**). Vam calcular la mitjana i la desviació estàndar de les dades

**Taula 3.14 Prova de Kolmogorov-Smirnov per Ln (espermina)**

Variable	Diferències més extremes			Z	P
	Absoluta	Positiva	Negativa		
Ln (espermina)	0,12737	0,10887	-0,12737	1,0348	0,2346

transformades i, a partir d'elles, vam estimar els percentils 2,5 i 97,5 a l'escala de dades transformades com:

$$[\text{mitjana}] \pm 1,960 \times [\text{desviació típica}]$$

Finalment, vam reconvertir aquests percentils a l'escala de les dades originals mitjançant la fórmula:

$$x = e^y$$

i vam obtenir els següents resultats:

percentil 2,5:	4,28	nmol / $10^{10}$ cèl.lules
percentil 97,5:	39,93	nmol / $10^{10}$ cèl.lules

### Estimació paramètrica dels percentils de l'espermidina i l'EPD/EPM

El càlcul dels percentils per a les variables amb una distribució gaussiana es va fer a partir de:

$$[\text{mitjana}] \pm 1,960 \times [\text{desviació típica}]$$

Per l'espermidina doncs,

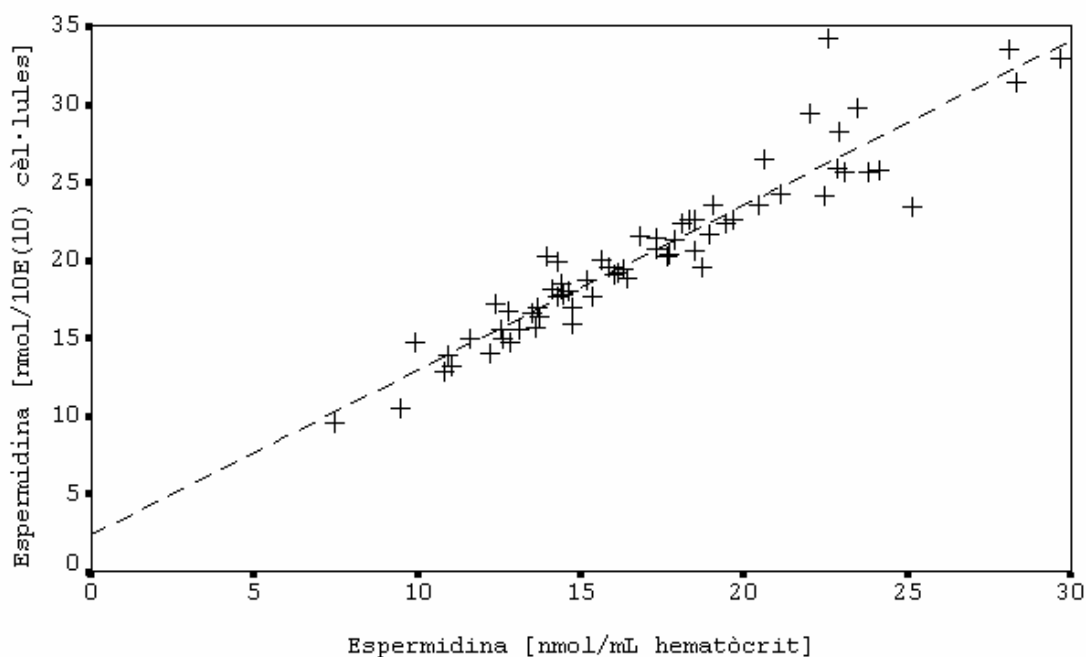
percentil 2,5:	9,95	nmol / 10 <sup>10</sup> cèl.lules
percentil 97,5:	30,89	nmol / 10 <sup>10</sup> cèl.lules

i per l'EPD/EPM,

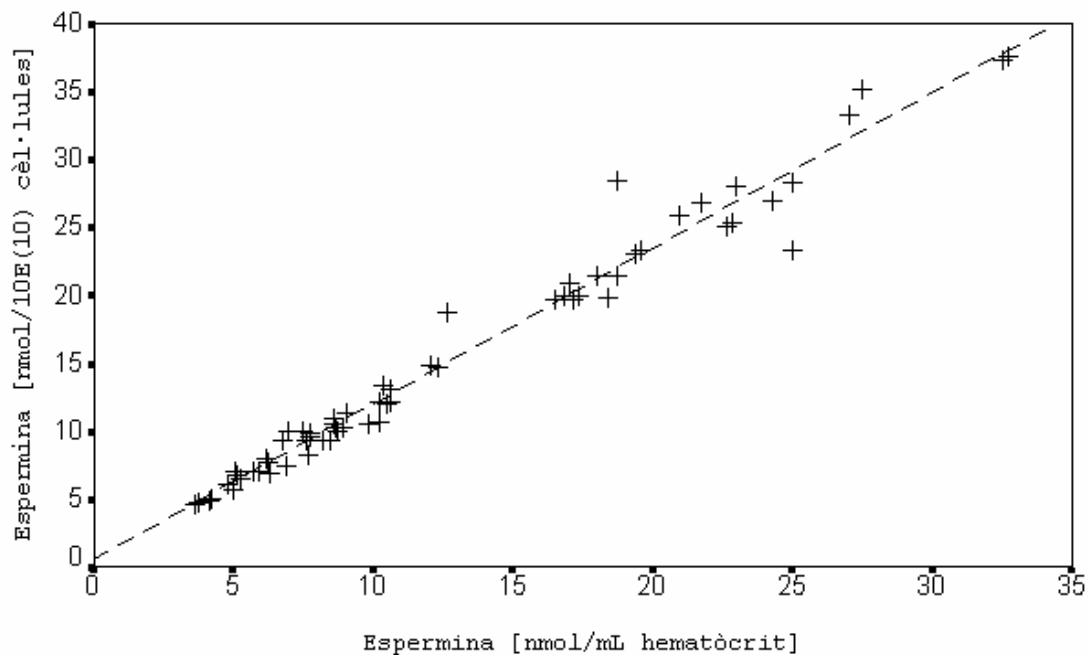
percentil 2,5:	0,12	nmol / 10 <sup>10</sup> cèl.lules
percentil 97,5:	3,30	nmol / 10 <sup>10</sup> cèl.lules

#### 3.1.1.5 Equivalència de les unitats d'expressió de les concentracions de poliamines

Malgrat que l'expressió de la concentració de poliamines en sang referida al nombre de eritròcits en la mostra és una mesura més acurada que la concentració referida al volum d'empaquetat eritrocitari (mL), aquesta última és d'ús generalitzat i és una alternativa de la qual disposar quan no es possible mesurar la concentració de cèl.lules (p. ex., en mostres de procedència exterior). Així doncs, en totes les mostres d'individus de referència vam recollir el volum d'empaquetat eritrocitari analitzat i el recompte de eritròcits per mL. A les **Figures 3.7** i **3.8** es poden veure la correlació entre ambdues unitats de concentració per a les dues poliamines.



**Figura 3.7** Correlació entre les unitats de concentració d'espermidina en sang.



**Figura 3.8** Correlació entre les unitats de concentració d'espermina en sang.

Mitjançant l'anàlisi de regressió lineal es van obtenir les equacions que relacionen ambdues unitats de concentració i els coeficients de correlació per a l'espermidina,

$$[\text{nmol}/10^{12} \text{ cèl.lules}] = 1,058 \cdot [\text{nmol}/\text{mL hematòcrit}] + 2,375 \quad r = 0,95$$

i l'espermina,

$$[\text{nmol}/10^{12} \text{ cèl.lules}] = 1,147 \cdot [\text{nmol}/\text{mL hematòcrit}] + 0,581 \quad r = 0,99$$

### 3.1.1.6 Relació de les poliamines amb els paràmetres eritrocitaris

Es va mesurar l'associació entre les PA i els diferents paràmetres eritrocitaris de les proves hematològiques, practicades en les mateixes mostres, mitjançant el càlcul del coeficient de correlació lineal de Pearson, per l'espermidina i l'EPD/EPM, i de Spearman per l'espermina (**Taula 3.15**). Cap associació entre variables, tret de l'espermina *vs.* hemoglobina corpuscular mitjana, va mostrar un coeficient de correlació rellevant amb un nivell de significació inferior a 0,05. El recompte de cèl.lules, la concentració d'hemoglobina i la distribució del volum de les cèl.lules presenten una relació inversa amb

la concentració de les poliamines, mentre que els índex de tamany cel.lular i de contingut en hemoglobina (VCM, HGBM i CHGBM) presenten una relació directa.

**Taula 3.15 Correlació lineal entre les poliamines en sang i els paràmetres eritrocitaris**

	Eritròcits	HGB	Hematòcrit	VCM <sup>2</sup>	HGBCM <sup>3</sup>	CHGBCM <sup>4</sup>	DVH <sup>5</sup>
Espermidina	-0,254 <sup>1</sup> (p=0,053)	-0,165 (p=0,200)	-0,206 (p=0,108)	0,129 (p=0,318)	0,204 (p=0,112)	0,178 (p=0,166)	-0,028 (p=0,831)
Espermina	-0,330 (p=0,009)	-0,138 (p=0,285)	-0,187 (p=0,146)	0,318 (p=0,012)	0,456 (p=0,001)	0,228 (p=0,075)	-0,123 (p=0,343)
EPD/EPM	0,191 (p=0,137)	0,043 (p=0,743)	0,077 (p=0,552)	-0,262 (p=0,040)	-0,322 (p=0,011)	-0,163 (p=0,207)	0,062 (p=0,633)

<sup>1</sup> Els valors representen el coeficient de correlació (nivell de significació). <sup>2</sup> VCM: volum corpuscular mig; <sup>3</sup> HGBM: hemoglobina corpuscular mitja; <sup>4</sup> CHGBCM: concentració hemoglobina corpuscular mitja; <sup>5</sup> DVH: distribució del volum dels eritròcits.

### 3.1.2 Poliamines en sang en pacients amb una resecció intestinal

Els nivells d'espermidina en sang en pacients amb resecció intestinal van ser significativament més grans ( $p < 0,05$ ) que en la població de referència. Els nivells d'espermina i l'EPD/EPM també van ser superiors però les diferències no van ser significatives (**Taula 3.16**). Quan es va dividir el grup de pacients segons el temps transcorregut des de la intervenció, el subgrup de pacients resecats menys de tres anys abans de l'anàlisi ( $n = 4$ ) continuava mostrant una diferència significativa en els nivells d'espermidina i uns nivells més alts, no significatius, d'espermina. Els pacients considerats clínicament adaptats ( $n = 5$ ) van presentar nivells incrementats, no significatius, d'espermidina i nivells disminuïts, no significatius, d'espermina respecte als valors de referència.

**Taula 3.16 Poliamines en sang en pacients amb resecció intestinal**

	n	Espermidina	Espermina	EPD / EPM
Controls	66	20,4 ± 7,4	15,7 ± 9,5	1,71 ± 0,51
<b>Pacients SIC</b>				
Resecció < 3 anys	4	28,5 ± 12,0*	26,8 ± 14,6	1,64 ± 0,71
Resecció > 3 anys	5	24,5 ± 12,4	13,6 ± 5,2	2,04 ± 1,05
Total	9	26,2 ± 11,9*	19,5 ± 9,5	1,86 ± 0,88

Els resultats s'expressen com la mitjana ± desviació típica. \* Diferències significatives respecte al grup control ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.3 Efecte antiperoxidatiu de les poliamines en els eritròcits

El valor mitjà d'alliberament de MDA en eritròcits de persones sanes sense estimulació va ser  $54,9 \pm 7,1$  nmol/g HGB (mitjana  $\pm$  desviació típica), sense diferències entre sexes i dintre del rang de normalitat previament descrit: 17-168 nmol/g HGB (Virgili *et al.* 1997). L'anàlisi estadística de la variança va demostrar que les disminucions observades en la producció de MDA en els eritròcits tractats amb espermidina i espermina respecte els no tractats tenien un alt grau de significació ( $p < 0,001$ ) (**Taula 3.17**). L'addició de putrescina, en canvi, no va mostrar cap influència sobre la producció de MDA.

**Taula 3.17 Alliberament de malonildialdehid en eritròcits de persones sanes estimulats amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presència de poliamines**

Poliamines $\mu\text{M}$	Producció de malonildialdehid (nmol/g HGB)			Inhibició %
	No estimulació	Estimulació Sense addició	Estimulació Amb addició	
Putrescina				
100	50	$469 \pm 33$	$546 \pm 26$	-
500	43	$914 \pm 35$	$884 \pm 35$	3
1000	50	$442 \pm 94$	$496 \pm 86$	-
Espermidina				
100	$32 \pm 17^1$	$859 \pm 89$	$759 \pm 154$	12
500	$28 \pm 14$	$608 \pm 131$	$225 \pm 28^*$	63
1000	$70 \pm 32$	$534 \pm 75$	$300 \pm 75^*$	44
Espermina				
100	$93 \pm 40$	$772 \pm 20$	$665 \pm 105$	14
500	$74 \pm 15$	$444 \pm 31$	$109 \pm 50^*$	76
1000	$71 \pm 32$	$669 \pm 102$	$224 \pm 83^*$	67

<sup>1</sup> Mitjana  $\pm$  desviació típica. \* Diferències significatives vs. mostres sense addició ( $p < 0,001$ ).

Els resultats de l'addició d'espermina 1000  $\mu\text{M}$  a eritròcits de pacients amb patologia associada a estrès oxidatiu es mostren a la **Taula 3.18**. La inhibició sobre la producció de MDA va ser de la mateixa magnitud que l'observada en mostres de subjectes normals estimulades amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Taula 3.18 Alliberament de malonildialdehid en eritròcits de persones amb estrès oxidatiu en presència d'espermina**

Cas	Producció de malonildialdehid (nmol/g HGB)		Inhibició %
	Sense addició	Amb addició	
1	$511 \pm 45^1$	$186 \pm 65$	64
2	$462 \pm 40$	$221 \pm 68$	52
3	$690 \pm 46$	$273 \pm 48$	61
4	$739 \pm 98$	$413 \pm 58$	44

<sup>1</sup> Mitjana  $\pm$  desviació típica.

## 3.2 Poliamines en el budell

### 3.2.1 Poliamines en la síndrome de l'intestí curt

#### 3.2.1.1 Nivells d'ornitina i poliamines en la mucosa intestinal

Les concentracions intestinals de l'ornitina i de les tres poliamines es presenten a la **Taula 3.19**. Els pacients SIC estudiats van mostrar uns nivells molt superiors d'ornitina, en promig més del doble, que els controls de jejú, malgrat que aquest augment no va ser significatiu ( $p = 0,30$ ) degut a la dispersió dels valors en el grup SIC. La diferència respecte al control d'ili va ser d'un 78% no significativa ( $p = 0,22$ ). Els valors de putrescina i d'espermidina en aquests pacients són intermitgós entre els controls d'ili i jejú, sense diferències significatives amb cap d'ells ( $p = 0,12$  i  $0,079$  respectivament). La poliamina predominant en tots els teixits examinats és l'espermina, la qual assoleix el seu valor màxim en la mucosa jejunal. La concentració d'espermina en els pacients és molt similar a la trobada en el grup Control Ili, i ambdues són significativament inferiors ( $p = 0,044$  i  $0,011$  respectivament) a l'espermina jejunal. Les dades de l'EPD/EPM són molt similars en tots els grups. De fet, la mitjana aritmètica de totes elles és  $0,56$  ( $n = 25$ ) i només en dos pacients del grup Control Ili es van trobar valors  $> 1$ .

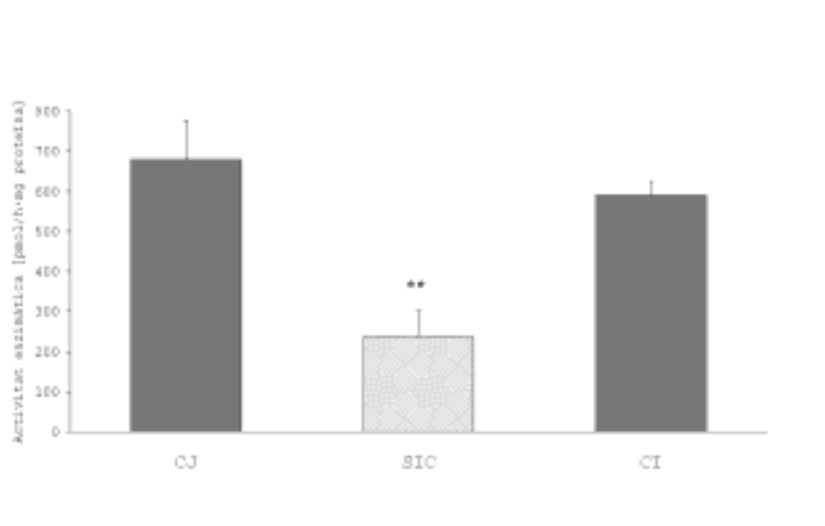
**Taula 3.19 Concentracions d'ornitina i poliamines en la mucosa intestinal de pacients amb la síndrome de l'intestí curt i jejunostomia**

	Control Jejú ( $n = 6$ )	Pacients SIC ( $n = 6$ )	Control Ili ( $n = 13$ )
Ornitina	$3,23 \pm 0,89^1$	$7,17 \pm 2,16$	$4,02 \pm 0,67$
Putrescina	$0,71 \pm 0,21$	$0,54 \pm 0,11$	$0,36 \pm 0,06$
Espermidina	$4,52 \pm 0,68$	$3,38 \pm 0,53$	$2,95 \pm 0,63$
Espermina	$8,09 \pm 0,81$	$5,50 \pm 0,67^*$	$5,12 \pm 0,43^*$
EPD/EPM	$0,54 \pm 0,04$	$0,61 \pm 0,06$	$0,57 \pm 0,10$

<sup>1</sup> Els resultats s'expressen en nmol/mg proteïna i són la mitjana  $\pm$  DT de l'anàlisi de dues biopsies. \* Grup amb un mitjana significativament diferent ( $p < 0,05$ ) a la del Control Jejú.

### 3.2.1.2 Activitat omitina descarboxilasa

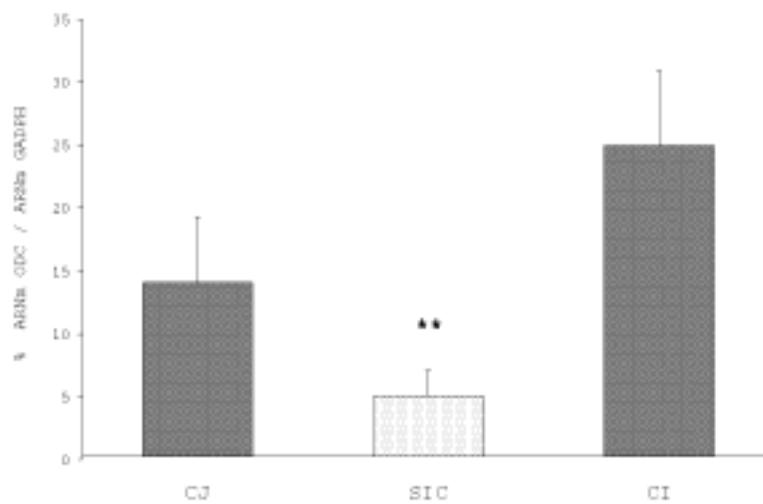
Vam observar una activitat molt baixa en la mucosa del budell remanent dels pacients SIC, que constituïa un 35% de l'activitat jejunal ( $p = 0,012$ ) i un 40% de l'activitat ileal ( $p = 0,027$ ) (**Figura 3.9**). Les mostres de mucosa jejunal van mostrar un 15% més d'activitat ODC que les mostres d'ili.



**Figura 3.9** Activitat ODC en la mucosa intestinal de pacients amb la síndrome de l'intestí curt (SIC) amb jejunostomia. CJ: control jejú, CI: control ili. \*\* diferència estadística ( $p < 0,05$ ) respecte a CJ i CI.

### 3.2.1.3 ARN missatger de l'ornitina descarboxilasa

Novament, els pacients SIC van presentar valors significativament inferiors d'ARNm-ODC ( $p = 0,019$  vs CJ i  $p = 0,006$  vs CI) respecte als grups control (un 80% i un 64% més baixos, respectivament) (**Figura 3.10**). Contràriament a l'activitat ODC, vam observar que la quantitat de trànscrips d'ODC presents al jejú era un 44% inferior a la de la mucosa ileal.

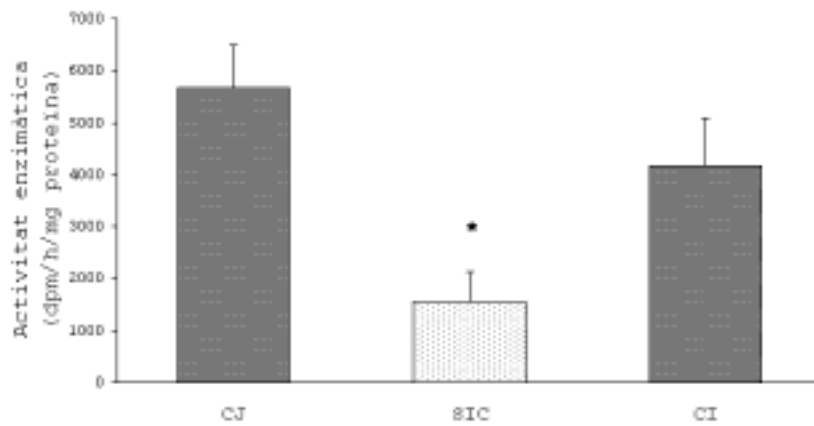


**Figura 3.10** ARNm-ODC en la mucosa intestinal de pacients amb la síndrome de l'intestí curt amb jejunostomia. CJ: control jejú, CI: control ili. \*\* diferència estadística ( $p < 0,05$ ) respecte a CJ i CI.



### 3.2.1.4 Activitat diamina oxidasa

El patró d'activitat enzimàtica observat per l'ODC es va tornar a reproduir en el cas de la DAO oxidasa (**Figura 3.11**). Els pacients SIC van mostrar una activitat DAO 73% inferior a la del control jejú ( $p = 0,017$ ) i 63% inferior a a la del control ili ( $p = 0,31$ ). Per la seva part, l'activitat DAO jejunal va ser un 36% més gran que la ileal.



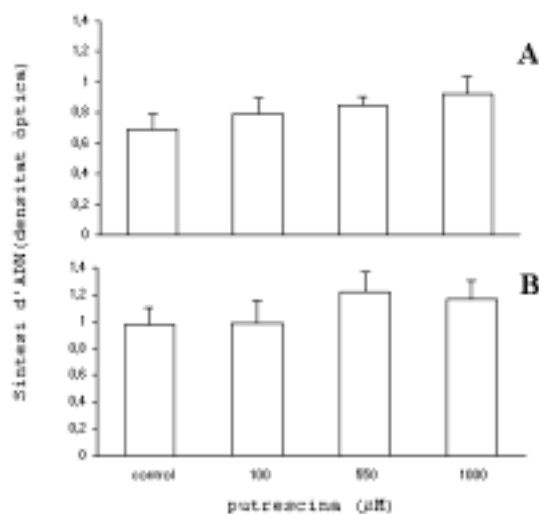
**Figura 3.11** Activitat DAO en la mucosa intestinal de pacients amb la síndrome de l'intestí curt amb jejunostomia. CJ: control jejú, CI: control ili. \* diferència estadística ( $p < 0,05$ ) respecte a CJ.

## 3.2.2 Poliamines en el càncer colorectal

### 3.2.2.1 Paper de la putrescina exògena en el creixement de cèl.lules CT-26

#### *Proliferació cel.lular*

La presència de putrescina exògena en concentracions 100, 550 i 1000  $\mu\text{M}$  en el medi de cultiu de cèl.lules CT-26 va provocar un augment significatiu ( $p < 0,05$ ) en la síntesi d'ADN en totes les dosis estudiades respecte a cèl.lules no tractades. Aquest efecte va ser dosi-depenent, com es pot veure a la **Figura 3.12**. Quan el mateix experiment es va dur a terme afegint aminoguanidina 1 mM, la relació entre proliferació i la dosi de putrescina es va mantenir. Malgrat que la comparació de les mitjanes no va mostrar diferències entre els grups control i 100  $\mu\text{M}$  l'anàlisi de la variança va trobar de nou una associació significativa entre les variables proliferació cel.lular i concentració de putrescina en el medi.



**Figura 3.12** Síntesi d'ADN en cèl.lules CT-26 tractades amb putrescina durant 24 h, en absència (A) o presència (B) d'aminoguanidina 1 mM.

### Concentracions de poliamines

L'anàlisi cromatogràfic dels cultius de CT-26 control va mostrar com a les 24 h de l'addició de medi fresc la putrescina era la poliamina predominant en aquestes cèl.lules; dues vegades més abundant que l'espermidina i 10 vegades més que l'espermina (**Taula 3.20**). L'anàlisi de mostres del medi de cultiu dels controls va revelar com en 24 h el creixement dels cultius genera unes concentracions extracel.lulars de  $0,94 \pm 0,09 \mu\text{M}$  putrescina i  $0,60 \pm 0,07 \mu\text{M}$  espermidina. No es va detectar espermina extracel.lular.

**Taula 3.20** Concentracions de poliamines en cèl.lules CT-26 tractades amb putrescina

	Putrescina ( $\mu\text{M}$ )			
	0	100	550	1000
Putrescina	$1,02 \pm 0,05^1$	$2,17 \pm 0,05$	$2,89 \pm 0,21$	$4,23 \pm 0,40$
Espermidina	$0,55 \pm 0,01$	$1,44 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,02$	$1,68 \pm 0,04$
Espermina	$0,11 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$
EPD/EPM	$5,2 \pm 0,1$	$6,6 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,6$

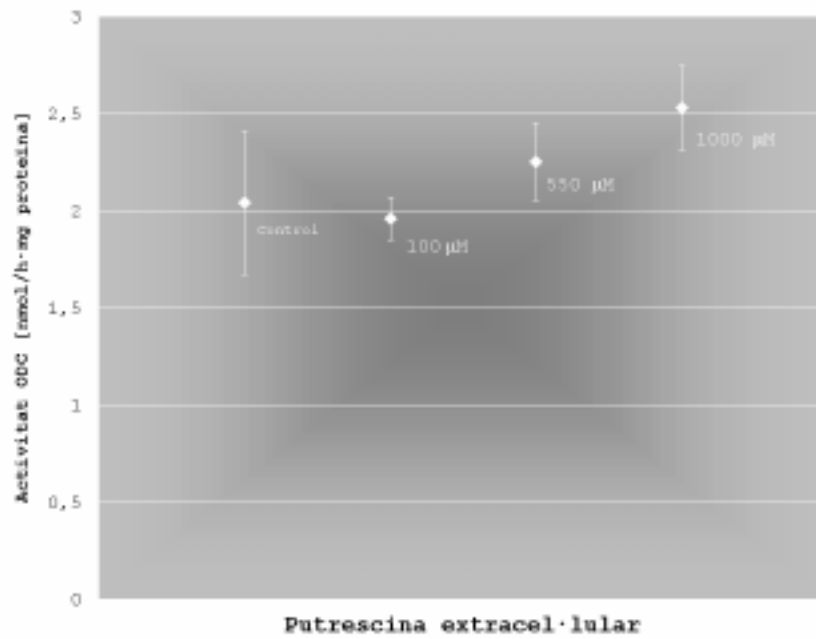
<sup>1</sup> Els resultats s'expressen en nmol/mg proteïna i són la mitjana  $\pm$  DT de tres experiments.

En el rang de concentracions estudiat, les cèl.lules exposades a la putrescina van acumular la molècula de forma proporcional a la dosi afegida, de manera que a les 24 h la concentració intracel.lular d'equilibri amb el medi era 2, 3 i 4 vegades la concentració dels controls amb un coeficient de correlació lineal  $r = 0,985$ .

La concentració d'espermidina també es va incrementar a les cèl.lules tractades (un 100% en les dosis 100 i 550  $\mu\text{M}$  i un 200% en la dosi 1000  $\mu\text{M}$ ). En l'espermina es va observar un increment del 100% respecte als controls de forma independent a la dosi de putrescina.

### Activitat ornitina descarboxilasa

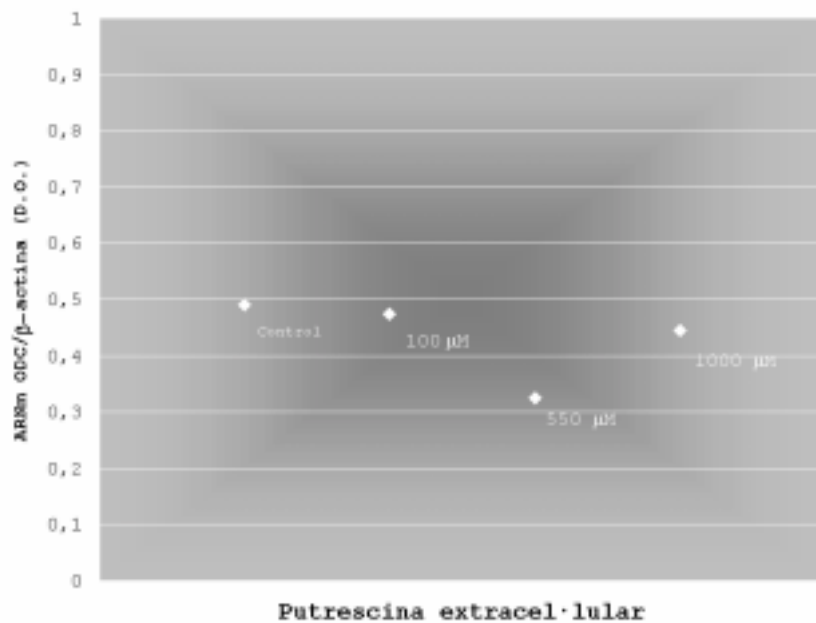
L'activitat ODC en cèl.lules CT-26 a les 24 h de l'addició de putrescina va resultar invariable en cèl.lules tractades amb 100  $\mu\text{M}$  i va mostrar un lleuger augment en les dues dosis més altes respecte als controls. Les diferències no van ser significatives (**Figura 3.13**).



**Figura 3.13** Activitat ODC en cultius de cèl·lules CT-26 tractades amb putrescina 24h. Cada punt representa la mitjana de tres experiments.

*ARN missatger de l'ornitina descarboxilasa*

No es van detectar canvis en l'expressió del transcrit de l'ODC en les cèl·lules CT-26 tractades amb putrescina. A la **Figura 3.14** es veu la seva expressió respecte a la del gen de



**Figura 3.14** ARNm-ODC en cultius de cèl·lules CT-26 tractades amb putrescina 24h. Cada punt representa la mitjana de dos experiments.

la  $\beta$ -actina.

### 3.2.2.2 Expressió de l'antienzim en tumors colorectals

#### *Optimització d'un assaig Western blot per detectar l'AZ en la mucosa intestinal humana*

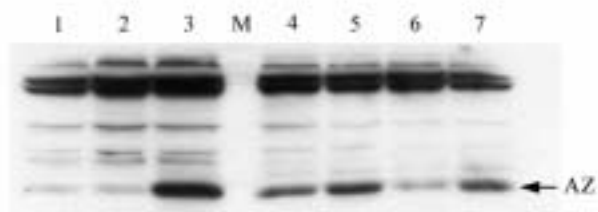
Per detectar la proteïna de l'antienzim vam utilitzar, inicialment, un anticòs policlonal contra l'antienzim de ratolí (AZr). Una fracció de l'anticòs purificat per afinitat no va mostrar activitat contra l'AZ humà (AZh) de cèl.lules K-562. La immunització per fabricar-ho s'havia dut a terme en dos conills, però només un dels dos antisèrums originats havia estat purificat per afinitat en experiments anteriors (Nilsson *et al.* 1997). Per determinar si els antisèrums dels conills exhibien activitat contra AZh, vam utilitzar les fraccions IgG corresponents. La fracció IgG de l'antisèrum no purificat va mostrar una forta interacció amb l'antienzim humà (**Figura 3.15**) i es va utilitzar per posar al punt un assaig Western blot. La identificació i el seguiment de la proteïna AZh en els *blots* es va dur a terme amb diferents marcadors de pes molecular i amb dos controls amb patrons d'expressió previament descrits. El tractament de les cèl.lules amb putrescina 10 mM durant 18-24 hores induïa la sobreproducció d'AZ i es va utilitzar com a control (+) (Heller *et al.* 1997), mentre que el tractament amb DFMO 20 mM durant 24-48 h anul.lava per complet l'expressió de la proteïna AZ i es va utilitzar com a control (-) (Nilsson *et al.* 1997).



**Figura 3.15** Comparació entre els dos anticossos anti-AZr respecte a la seva abilitat per reaccionar amb la proteïna humana. L'autoradiograma de l'esquerra mostra una forta interacció amb proteïnes extretes de cèl.lules humanes K-562 cells d'un dels anticossos que no s'observa en l'altre anticòs mostrat a la dreta. Les cèl.lules es van fer créixer en absència (carril 1) o presència (carril 2) de DFMO 20 mM o en presència de putrescina 10 mM (carril 3). M = marcador de pes molecular.

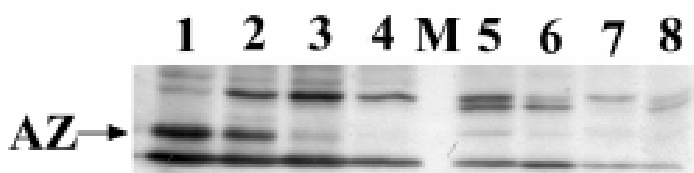
En experiments de sensibilitat de l'assaig, es van cultivar cèl.lules K-562/D20 en presència o absència de DFMO 20mM durant 4 dies i es va analitzar el seu contingut d'AZ en els dies 2 i 4 de tractament. L'autoradiograma resultant (**Figura 3.16**) mostra com: (a) les K-562/D20 que creixen sense DFMO en el medi sobreexpressen l'AZ respecte a les tractades (carrils 5 vs 4 i 7 vs 6); (b) en les cèl.lules tractades la producció

d'AZ decreix entre els dies 2 i 4 (carrils 4 vs 6) i (c) la diferència en l'expressió observada en (a) augmenta al dia 4 respecte al dia 2.



**Figura 3.16** Anàlisi Western blot de l'antienzim humà. Cèl.lules K-562 es van cultivar en absència (carril 1) o presència (carril 2) de DFMO 20 mM o en presència de putrescina 10 mM (carril 3). Les cèl.lules K-562/D20 es van fer créixer en el seu medi de creixement normal (contenint DFMO 20 mM) durant 2 dies o 4 dies (carrils 4 i 6, respectivament), o en medi de creixement sense DFMO durant el mateix període de temps (carrils 5 i 7).

Una cop detectat l'AZh en blasts K-562 amb l'anticos antiAZr, vam provar de fer-ho en cèl.lules epitelials Caco-2 i biòpsies de mucosa intestinal. A la **Figura 3.17** es mostra un autoradiograma amb l'expressió de tots els tipus de mostra mencionats. L'expressió de l'AZ en cèl.lules Caco-2 tractades amb putrescina, DFMO i en medi de creixement sol es similar



**Figura 3.17** Expressió de l'AZ en cèl.lules Caco-2 i en biòpsies intestinals humanes. Les cèl.lules es van cultivar en absència (carril 3) o presència (carril 4) de DFMO 20 mM i en presència de putrescina 10 mM (carril 2). Com a control (+) es va utilitzar una mostra de proteïnes extretes de cèl.lules K-562 tractades amb putrescina 10 mM (carril 1). En els carrils 5-8 es pot observar l'expressió de l'AZ en biòpsies de mucosa intestinal humana sana d'ili (carril 5), còlon (carril 6) i jejú (carrils 7 i 8).

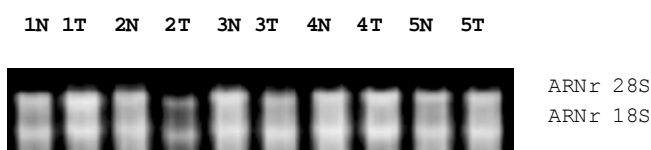
a l'obtinguda en cèl.lules K-562. Les cèl.lules Caco-2, a diferència de K-562, quan es tractaven amb DFMO 20 mM 48 h encara mostraven un senyal significatiu d'AZ.

Possiblement, resisteixen millor la inhibició d'AZ perquè el seu creixement en monocapa els permet reduir les concentracions intracel·lulars efectives de DFMO. Finalment, es van analitzar mostres de jejú, ili i colon per verificar la possibilitat de detectar l'antienzim en biòpsies de mucosa intestinal humana (**Figura 3.17**). El senyal d'AZ en els autoradiogrames de mostres intestinals va resultar més feble que l'obtingut en cultius cel·lulars per a una mateixa quantitat de proteïna total carregada. Això es deu a l'alta expressió de proteïnes estructurals i d'altres components del teixit en les biòpsies. El senyal es va augmentar sensiblement carregant quantitats de proteïna total de teixit en el límit de la capacitat dels gels de poliacrilamida

#### *Detecció de l'antienzim en tumors colorectals*

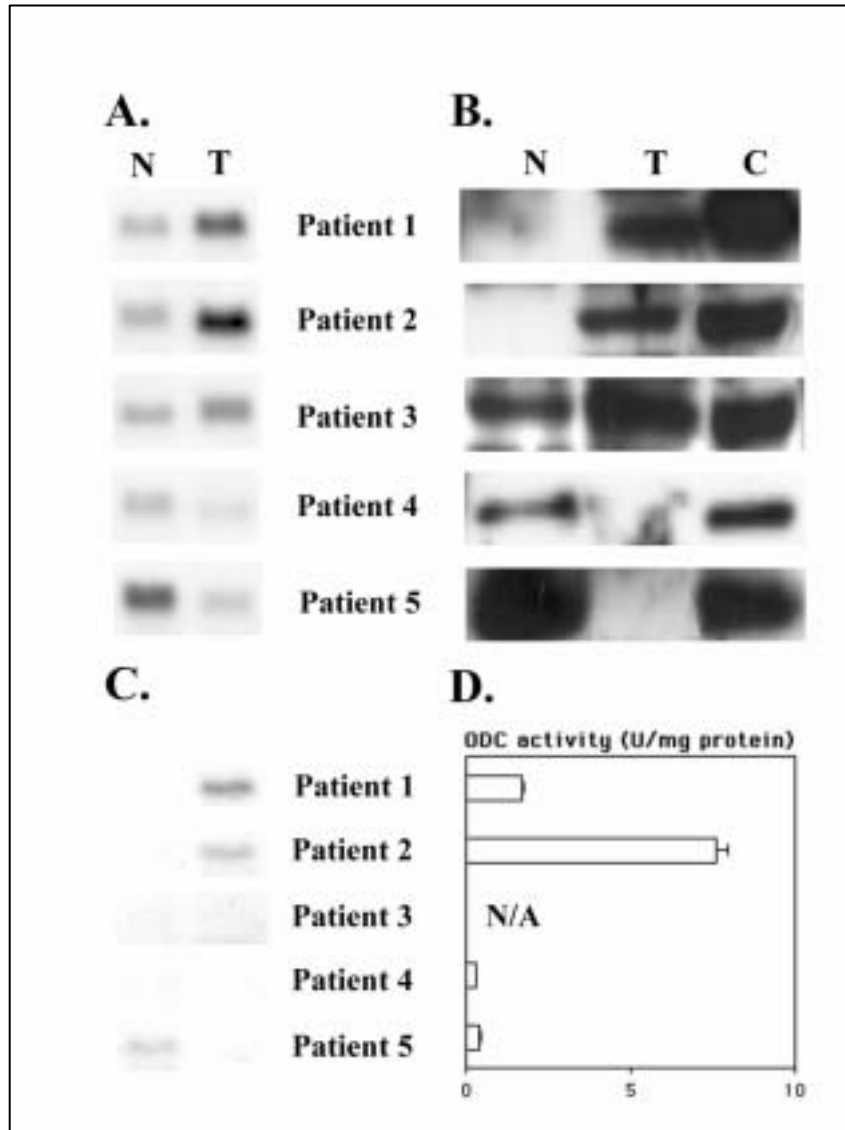
Un cop optimitzat l'assaig Western blot en cèl·lules i comprovada l'aparició d'un senyal consistent en biòpsies, es va utilitzar l'anticòs per analitzar l'expressió diferencial de la proteïna en mostres aparellades de mucosa sana i teixit tumoral de 5 individus amb càncer de còlon (Grup III.A). Els resultats es van interpretar en relació amb d'altres paràmetres que condicionen o depenen de l'abundància de la proteïna AZ: l'ARNm-AZ, la transcripció i l'activitat de l'ODC, i les concentracions de PA. També, es van revisar les característiques locals dels tumors .

La **Figura 3.19** il·lustra els resultats corresponents a l'AZ i l'ODC. Previament, a la **Figura 3.18** es mostra el fraccionament de l'ARN total de cada biòpsia utilitzat després per detectar els ARNm de l'AZ i l'ODC. És de destacar, en primer lloc, com l'expressió de la proteïna AZ seguia de forma fidel el patró d'expressió del seu ARN missatger en tots 5 pacients: els tumors dels pacients 1-3 van sobreexpressar trànscrip i proteïna respecte a la mucosa no afectada, mentre que en els tumors dels pacients 4 i 5 aquesta expressió va ser inferior. La transcripció de l'ODC mostra el mateix patró d'expressió diferencial en els pacients 1-3 *vs*



**Figura 3.18** Mostres d'ARN total del grup III.A resoltes en un gel d'agarosa 1,2% / formaldehid, tenyides amb bromur d'etidi i il·luminades amb llum UV.

4-5 i la magnitud dels canvis observats és molt semblant a la de l'ARNm-AZ. Quan vam analitzar l'activitat enzimàtica ODC en els tumors vam observar que era notablement més alta (entre 3 i 15 vegades superior) en els pacients 1 i 2 respecte als pacients 4 i 5 (el pacient 3 no es va poder analitzar per mostra insuficient).



**Figura 3.19** Expressió comparada de l'ARNm (A) i la proteïna (B) de l'AZ i de l'ARNm (C) i l'activitat (D) de l'ODC en mucosa colònica sana (N) i tumoral (T) dels pacients del grup III.A. En (B): C és un control de cèl.lules Caco-2 tractades amb putrescina. En (D) el pacient 3 no va ser analitzat per mostra insuficient.

A la **Taula 3.21** es mostren les concentracions tissulars de poliamines en els cinc pacients estudiats. Els pacients 1-3 mostren tumors més rics en poliamines que la mucosa colònica en correspondència amb el patró d'expressió d'AZ i ODC, en canvi el tumor del pacient 4 segueix la tendència contrària amb nivells inferiors especialment significatius d'espermidina i espermina (50% i 35% del contingut de la mucosa sana, respectivament). Els resultats



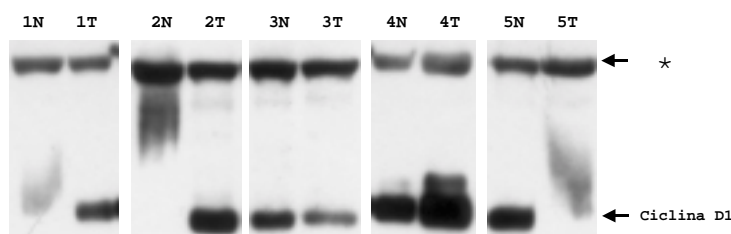
obtinguts en el pacient 5 són remarcables perquè els seus nivells de poliamines són ostensiblement més alts en el tumor (de forma molt similar als observats en els pacients 1-3), mentre que l'AZ i l'ODC tumorals s'expressen menys (especialment la proteïna AZ apenes es podia detectar).

**Taula 3.21 Concentracions de poliamines en biòpsies de mucosa colònica de pacients intervinguts de carcinoma colorectal**

Pacient	Putrescina		Espermidina		Espermina	
	Normal	Tumoral	Normal	Tumoral	Normal	Tumoral
1	25,0 ± 0,5 <sup>1</sup>	23,3 ± 3,7	151 ± 6	234 ± 17	359 ± 15	530 ± 51
2	24,7 ± 3,6	40,0 ± 4,3	197 ± 2	396 ± 12	475 ± 15	490 ± 13
3	17,2 ± 0,4	39,8 ± 5,3	108 ± 3	188 ± 18	285 ± 12	408 ± 6
4	8,89 ± 0,39	7,27 ± 0,86	170 ± 3	89 ± 8	480 ± 10	170 ± 6
5	17,4 ± 2,1	37,8 ± 6,5	99,3 ± 2,6	276 ± 12	272 ± 7	482 ± 21

<sup>1</sup> Els resultats s'expressen en pmol/mg proteïna i són la mitjana ± DT de tres biòpsies.

La **Figura 3.20** mostra l'anàlisi Western blot de la ciclina D1 en mostres aparellades dels cinc pacients. Contràriament a la nostra hipòtesi inicial, el patró d'expressió d'aquesta proteïna reguladora del cicle cel.lular no va mostrar una relació aparent amb l'expressió de l'AZ. En els pacients 1 i 2 els tumors van sobreexpressar la ciclina D1, però en el tumor del pacient 3 aquesta expressió va disminuir. Les dues mostres del pacient 4 van mostrar abundants nivells de ciclina D1 amb un efecte total de sobreexpressió en el tumor i, finalment, en el pacient 5 va aparèixer un tumor amb expressió reprimida o degradació superior al teixit normal.



**Figura 3.20** Western blot de la ciclina D1 en pacients del grup III.A. La banda assenyalada amb (\*) i els smears poden ser productes de poliubiquitinació de la ciclina D1 donat que no aparèixen en cèl.lules Caco-2 diferenciades.

A la **Taula 3.22** es poden veure algunes característiques rellevants de l'anàlisi anatomopatològic dels tumors estudiats. Els tumors dels pacients 1-3 tenien en comú el fet de no presentar permeació limfàtica ni venosa mentre que eren heterogenis en quant al grau histològic de diferenciació i el tamany. Els tumors dels pacients 4 i 5 eren de tamany semblant amb un grau moderat de diferenciació i presentaven permeació limfàtica i permeació venosa. En el pacient 4 els graus de permeació eren significativament majors que en el pacient 5.

**Taula 3.22 Característiques dels tumors primaris dels pacients del grup III.A**

Cas	Tamany (cm)	Grau Histològic <sup>1</sup>	Permeació Limfàtica <sup>2</sup>	Invasió Venosa <sup>2</sup>	Necrosi intratumoral	Inflamació
1	4	I	No	No	No	No
2	3	III	No	No	20%	No
3	7	I/25%M	No	No	15-20%	Pseudo-Crohn
4	6	II	+++	+++	10%	No
5	6	II/10%M	+	+	30%	No

<sup>1</sup> I: Ben diferenciat, II: Moderadament diferenciat i III: Poc diferenciat /M: Tumor amb component mucinos. <sup>2</sup> +: Extramural, ++: Moderada, +++: Profunda

### 3.2.2.3 Quantificació de l'ARN missatger de l'ODC en tumors colorectals

Es va quantificar l'ARNm de l'ornitina decarboxilasa en un grup de 9 pacients amb carcinoma colorectal (III.B) en mostres aparellades de mucosa colònica. Paral·lelament, es van determinar les concentracions de poliamines en les mateixes mostres, es van recollir les dades clíniques i anatomopatològiques i es van obtenir els nivells plasmàtics preoperatoris de l'antígen carcinoembrionari (CEA) i l'antígen carbohidrat 19-9 (CA 19-9) de tots els pacients. Totes les variables quantitatives analitzades van presentar una distribució normal per la prova de Kolomogorov-Smirnov ( $p > 0,05$ ).

El nombre de trànscripats ARNm-ODC en els teixits es va normalitzar respecte a l'ARNm del PBGD. Aquest enzim es codifica per un gen de molt baixa expressió i, en conseqüència, els valors numèrics d'ARNm-ODC normalitzats amb PBGD (rang: 42-1159) són alts en comparació als obtinguts en normalitzar amb altres gens d'expressió basal. Puix que existia la possibilitat d'obtenir un valor quantitatiu per mesurar la transcripció d'ODC en els teixits es va calcular la transcripció relativa del tumor respecte a la mucosa colònica mitjançant el quocient:

$$\text{ARNm ODC (t/n)} = \text{ARNm ODC (tumor)} / \text{ARNm ODC (mucosa còlon)}$$

És destacable la gran variabilitat biològica de l'expressió de l'ARNm-ODC a la mucosa colònica sana, on la desviació típica del grup va resultar superior al valor de la mitjana (**Taula 3.23**). Les mostres tumorals van presentar un comportament semblant i, en conseqüència, el seu quocient era igualment variable: ARNm ODC (t/n) =  $3,35 \pm 3,84$  (mitjana  $\pm$  DT). Sis de nou tumors van mostrar una expressió ARNm-ODC (t/n) superior a 1; no obstant, l'ARNm-ODC en la mucosa sana va presentar un rang ampli de valors i això va determinar l'absència de significació estadística. Per altra part, tres pacients no van mostrar una transcripció d'ODC diferent en tumor i teixit sà. Un aspecte destacable dels resultats és que les dades d'expressió en la mucosa sana semblen indicar l'existència de dos subgrups. Un primer ( $n = 6$ ) amb valors d'ARNm ODC / ARNm PBGC al voltant de 100 còpies, i un altre ( $n = 3$ ) amb valors clarament superiors en el rang 584-1142 còpies d'ARNm ODC / ARNm PBGC. El darrer subgrup va mostrar, a la vegada, els valors més

alts de transcripció ODC en els tumors i, en total, es va observar una correlació lineal entre l'expressió d'ODC en els dos teixits ( $r = 0,69$ ;  $p = 0,041$ ).

**Taula 3.23 Concentracions d'ARNm-ODC i poliamines en biòpsies de mucosa colònica de pacients amb carcinoma colorectal (grup III.B)**

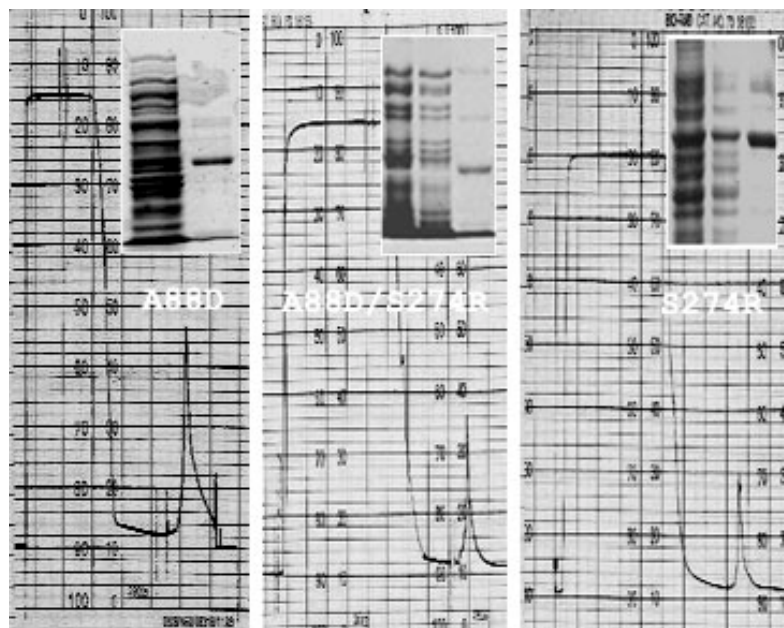
	Mucosa sana	Teixit tumoral
ARNm-ODC	354 ± 401 <sup>1</sup>	499 ± 328
Putrescina	19 ± 8 <sup>2</sup>	46 ± 31*
Espermidina	142 ± 49	285 ± 110*
Espermina	331 ± 150	496 ± 123
Epd/Epm	0,49 ± 0,31	0,59 ± 0,15

<sup>1</sup> N°còpies respecte a ARNm-PBGD. <sup>2</sup> pmol/mg proteïna (mitjana ± DT de l'anàlisi de dues biòpsies). \* Variable amb un mitjana significativament diferent ( $p < 0,05$ ) a la de la mucosa sana.

En relació a les concentracions de poliamines, les mitjanes de totes elles van ser clarament superiors en el grup de mostres tumorals (**Taula 3.23**). En analitzar les seves distribucions en els dos grups mitjançant la prova no paramètrica del signe-rang de Wilcoxon per mostres aparellades vam observar increments significatius per a la putrescina ( $p = 0,037$ ) i a per l'espermidina ( $p = 0,022$ ). Per a l'espermina ( $p = 0,14$ ) i per a l'EPD/EPM ( $p = 0,093$ ) no vam trobar significació estadística en els increments. Els nivells de transcripció d'ODC van mostrar un correlació significativa amb el quocient EPD/EPM en la mucosa sana amb  $r = 0,73$  i  $p = 0,024$ . Aquesta associació es va perdre en el teixit tumoral.

### 3.3 Activitat ODC en mutants de l'inhibidor de l'antienzim

En experiments inicials es van obtenir fraccions de proteïnes recombinants A88D/S274R AZI i S274R AZI purificades en columnes Ni-NTA que mostraven activitat ornitina descarboxilasa per sobre de l'activitat basal de la proteïna recombinant AZI (control (-)):  $6337 \pm 421$  (A88D/S274R) i  $5405 \pm 654$  (S273R) *vs*  $4942 \pm 178$  (AZI) Dpm en 10  $\mu$ L de volum d'eluat. Puix que es van trobar valors d'activitat semblants en bacteris no transfectats purificats (atribuïbles a ODC *E. coli* copurificada) es va fer impossible discriminar entre autèntiques diferències d'activitat entre proteïnes recombinants i diferències degudes al rendiment d'expressió dels clons respectius. A partir d'aquest punt, en no poder millorar la puresa de les proteïnes recombinants, vam treballar amb columnes d'afinitat HiTrap en condicions controlades de cromatografia (**Figura 3.21**).



**Figura 3.21** Expressió i purificació de proteïnes recombinants A88D (esquerra), A88D/S274R (centre) i S274R (dreta) AZI. En cada imatge es mostra la mesura de l'absorvència  $A_{280}$  durant l'elució de les proteïnes recombinants en columnes HiTrap. En els inserts es mostren les separacions per SDS/PAGE de les fraccions eluides. Les proteïnes es van visualitzar amb Coomassie Brilliant Blue G-250. El gel es va assecat, la imatge es va captar amb un escàner Snapscan (Agfa) i es va equilibrar i intensificar amb Adobe Photoshop 5.0.

El nou sistema ens va permetre obtenir proteïnes recombinants purificades amb una activitat de ~1.500 Dpm per AZI-(His)<sub>6</sub> i de 35.000 Dpm per ODC-(His)<sub>6</sub>. Com es pot veure a la **Taula 3.24**, cap de les tres proteïnes mutants de l'AZI va mostrar una activitat enzimàtica significativament superior a la de la proteïna AZI salvatge.

**Taula 3.24 Activitat ODC en proteïnes recombinants purificades amb columnes HiTrap**

	Activitat ODC (Dpm)
ODC	35.435 ± 1.452
A88D-AZI	1.831 ± 138
A88D/S274R-AZI	1.366 ± 174
S274R-AZI	2.137 ± 315
AZI	1.486 ± 108



# 4 Discussió

## 4 Discussió

### 4.0 Quantificació de poliamines en mostres biològiques

El mètode d'HPLC, optimitzat durant la primera fase d'aquesta tesi, va demostrar la seva versatilitat per quantificar els nivells de poliamines en diferents tipus de mostres: sang, cultius cel·lulars i teixits humans, amb bones prestacions. Els rangs de linealitat obtinguts van permetre determinar les tres molècules estudiades de forma satisfactòria en tots els experiments desenvolupats. El comportament cromatogràfic de l'espermidina va ser sempre el més homogeni de les tres poliamines i això es va reflexar en el seu rang de linealitat, coeficient de correlació i en la desviació estàndard dels replicats (qualsevol tipus de mostra). Malgrat que el rendiment quàntic d'emissió fluorescent (Q) de l'espermidina es inferior al de la putrescina (**Taula 2.20**), l'elució de la darrera a prop de pics massius d'altres substàncies reduïa sensiblement la reproduïbilitat de la seva quantificació. El mètode i l'equip instrumental van demostrar la seva flexibilitat per incorporar la detecció simultània de noves substàncies (p.ex., l'aminoàcid ornitina en mucosa intestinal) amb relativa facilitat.

### 4.1 Poliamines en la sang

Com ja s'ha comentat a la introducció, no existeixen uns valors de referència d'espermidina i d'espermina en sang internacionalment estaberts. Els grups de recerca que han treballat amb aquests paràmetres han fet servir els seus propis valors control obtinguts a partir de mostres de població "clínicament sana". En quasi tots els treballs publicats revisats es donen detalls mínims sobre els criteris d'exclusió i inclusió escollits, sent el tamany de la mostra i la distribució de l'edat i el sexe dels individus, les úniques dades que apareixen mencionades de forma regular. A efectes de comparar els nostres resultats amb el que hi ha descrit a la bibliografia es van consultar un total de disset treballs on es publiquen dades de poliamines en eritròcits humans (Cohen *et al.* 1976, Cooper *et al.* 1976, Saeki *et al.* 1978, Ota *et al.* 1986, Elworthy i Hitchcock 1989, von Essen *et al.* 1989, Bergeron *et al.* 1989, Cipolla *et al.* 1990, Gerbaut 1991, Bergeron *et al.* 1995, Cipolla *et al.* 1996, Seghieri 1997, Bergeron *et al.* 1997, Tsukamoto *et al.* 1997, Tsukamoto *et al.* 1999, Leveque *et al.* 1999, Els 2001). Les dades originals es van transformar en nmols de PA per  $10^{10}$  cèl·lules utilitzen les fórmules de l'apartat 3.1.1.5, i això va permetre observar com les mitjanes dels grups control per les dues poliamines s'agrupaven en els intervals (8,62-30,40 nmols/ $10^{10}$  cèl·lules) per l'espermidina i (5,38-15,35 nmols/ $10^{10}$  cèl·lules) per l'espermina. Els nostres resultats s'inclouen dintre d'aquests rangs en la part mitjana-alta (espermidina) i alta (espermina). En particular, les nostres concentracions de poliamines coincideixen plenament amb els valors

obtinguts en diferents treballs a les universitats de Birmingham (Elworthy i Hitchcock 1989, von Essen *et al.* 1989) i Osaka (Tsukamoto *et al.* 1997, Tsukamoto *et al.* 1999).

Precisament, un dels treballs publicats pel primer grup constitueix l'únic estudi sistemàtic dels valors de poliamines en sang en subjectes normals (Elworthy i Hitchcock 1989). En aquest estudi van participar 117 persones (55 dones i 62 homes) amb una edat mitjana de 39 anys (rang: 3-78) que havien acudit a l'hospital per problemes neurològics (disc prolapsat, neuropatia ulnar o dolor facial). Tant en aquest estudi com en el nostre, les concentracions de poliamines en sang van resultar independents de l'edat de les persones. Aquesta fet és difícil d'encaixar amb algunes de les idees més exteses sobre les poliamines: (a) els eritròcits incoren poliamines produïdes per diferents òrgans (Dorhout *et al.* 1997, Moulinoux *et al.* 1989) i (b) els teixits de la gent jove i, en general, els òrgans i teixits en creixement s'associen amb increments en les concentracions de poliamines (Heby *et al.* 1975, Janne *et al.* 1978, Scalabrino i Ferioli 1982). El coneixement que tenim avui dia del metabolisme de les poliamines en la circulació, això és, dels factors que regulen les seves concentracions eritròcitaris, així com de la seva funció real en aquestes cèl.lules es insuficient per explicar aquesta paradoxa. Els mecanismes d'entrada i sortida de les poliamines dintre de l'eritròcit no estan totalment caracteritzats. Per altra banda, es desconeix si en algun punt(s) del seu recorregut pel torrent sanguini, els eritròcits "reajusten" els seus nivells de poliamines en funció de les necessitats fisiològiques del cos o per evitar una hiperacumulació que podria resultar tòxica.

Tal i com van trobar Elworthy i Hichcock (1989), les concentracions de poliamines per nombre d'eritròcits van resultar independents del sexe dels individus en el nostre estudi. Puix que el nombre d'eritròcits circulants sí que és diferent en homes i dones (en el grup d'estudi en particular:  $4,3 \pm 0,3 \times 10^{12}$  cèl.lules/L per les dones i  $4,9 \pm 0,3 \times 10^{12}$  cèl.lules/L pels homes;  $p < 0,001$ ) es va estudiar si existien diferències per sexes en el total de poliamines en sang (**Taula 3.12**). Dones i homes presenten una quantitat molt semblant d'espermidina en sang (al voltant de 2  $\mu\text{M}$ ) i una quantitat similar d'espermina (una mica superior en les dones: 1,6  $\mu\text{M}$  *vs* 1,5  $\mu\text{M}$  en els homes). Si revisem les concentracions de PA per nombre d'eritròcits en funció del sexe (**Taula 3.10**) podem observar com ambdues poliamines són més abundats en l'eritròcit de les dones. Aquesta diferència compensa, doncs, el nombre inferior d'eritròcits en sang en les dones, de forma que no hi ha diferència entre les poliamines totals que circulen en sang entre els sexes.

L'hàbit del tabaquisme provoca un descens de 1,5-2,5 nmols/ $10^{10}$  cèl.lules en les poliamines en sang. Aquest canvi és més pronunciat en el cas de l'espermina i, en conseqüència, es produeix un lleuger augment del quocient EPD/EPM en els fumadors. Les diferències observades no van tenir significació estadística. Aquestes tendències es poden comparar amb el conegut efecte del tabac sobre la concentració d'hemoglobina: fumar produeix una quantitat suficient de CO en sang com per reduir la saturació de l'oxigen de l'hemoglobina, de forma que els grans fumadors (2-3 paquets per dia) presenten uns nivells de carboxihemoglobina de 10-15% i un augment d'hemoglobina en sang de 1 g/dL (Hillman i Finch 1996). En aquest subgrup de fumadors, l'augment és d'una magnitud important i condiona, p. ex., la diagnosi de policitemia. En el nostre nostre estudi, el grup de fumadors era heterogeni respecte a la quantitat de cigarretes consumides per dia i, consegüentment, vam observar un increment global de 0,29 g/dL d'hemoglobina sense significació estadística respecte a la resta d'individus. Així doncs, per valorar adequadament l'efecte del tabac sobre la concentració de poliamines en els fumadors serà



necessari treballar amb un grup de grans fumadors. Un altre aspecte a tenir en compte a l'hora d'estudiar la interacció tabac-poliamines en sang és la gran quantitat d'espècies reactives d'oxigen i radicals lliures que són aspirats en el fum del tabac. Com es pot llegir més endavant en aquesta discussió les poliamines mostren una activitat protectora contra la peroxidació lipídica de la membrana eritrocitària. Els decrements dels nivells eritrocitaris de PA observats en els fumadors podrien indicar un consum net de poliamines en la defensa contra la peroxidació. Existeixen evidències de la formació d'aldehids a partir d'espermina i espècies reactives d'oxigen *in vitro* (Ha *et al.* 1998). El fet que l'espermina, la PA amb major poder antioxidant, mostri un descens més marcat en els fumadors podria reforçar aquesta hipòtesi.

La distribució dels valors d'espermidina obtinguts en el nostre estudi va seguir una corba de Gauss amb una desviació típica relativament petita (5,34 en el nostre treball *vs.* 13,7 en el d'Elworthy i Hichcock (1989)). Valors per sobre de 30,9 i per sota de 10 nmol/10<sup>10</sup> cèl.lules queden fora d'aquest rang. La significació biològica dels valors > 30,9 nmol /10<sup>10</sup> cèl.lules es pot interpretar a partir dels treballs on es descriuen increments de les PA en sang: teixits en creixement, ja sigui en procés de regeneració (Bergeron *et al.* 1995, Tsukamoto *et al.* 1999) o durant el desenvolupament tumoral (Cipolla *et al.* 1990, Linsalata *et al.* 2000). Per contra, no hi ha dades sobre processos fisiològics o patològics associats a valors extremadament baixos d'espermidina.

La distribució de l'espermina en els individus estudiats es bimodal. Existeixen dues poblacions dintre del grup amb valors d'espermina diferents. Els dos grups no presenten cap tret distintiu ni en els paràmetres bioquímics mesurats ni en les seves característiques clíniques. Les dades presentades per Elworthy i Hichcock (1989) indiquen que el seu grup d'estudi té una distribució del mateix tipus amb una gran part de valors agrupats al voltant de 12 nmol/10<sup>10</sup> cèl.lules i un subgrup més petit amb valors més alts. Estudis més amplis amb criteris d'inclusió molt restrictius podrien ajudar a esbrinar que diferencia a les persones clínicament sanes amb valors al voltant de 10 nmol espermina/10<sup>10</sup> cèl.lules de les que presenten valors al voltant de 25. En absència d'aquests criteris, vam procedir a construir un interval de referència tal i com es fa en el cas d'altres paràmetres que no mostren una distribució gaussiana a la població normal (p. ex., els triglicèrids en plasma). L'interval obtingut es més ample que el de l'espermidina (4,3 - 39,9 nmol/10<sup>10</sup> cèl.lules). Així doncs, les poliamines en l'eritròcit en individus clínicament sans presenten un comportament diferenciat: algun factor(s) que condiciona la concentració d'espermina en persones normals no afecta a la concentració de l'espermidina.

El quocient EPD/EPM en sang és una dada rellevant que permet una comparació directa entre diferents treballs, obviant les diferències en el valor absolut de les concentracions de poliamines que resulten en emprar mètodes experimentals diferents. Les mitjanes d'EPD/EPM en els diferents grups controls revisats a la literatura estan dintre del rang 1,5 - 1,9. En el nostre estudi, vam obtenir un valor 1,71 associat a una gran dispersió: l'interval de referència anava de 0,12 a 3,3. A nivell biològic, es consideren rellevants els increments en EPD/EPM associats a augments en la síntesi d'ADN i en l'activitat proliferativa en cèl.lules, teixits i òrgans (Huber i Poulin 1996, Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez 1995, Wery *et al.* 1996). Puix que els eritròcits no tenen capacitat proliferativa, el quocient EPD/EPM en sang reflexa, presumiblement, el total d'activitat proliferativa de la resta d'òrgans, especialment d'aquells que presenten més activitat metabòlica o major producció de poliamines com el budell, el fetge o el cervell (White i Bardocz 1999). La

utilitat d'aquesta mesura, a diferència de la mesura directa d'EPD/EPM en els teixits (p. ex., Kubo *et al.* 1998, Mitchell *et al.* 1998), és encara incerta.

Es va estudiar la relació de les poliamines amb els paràmetres eritrocitaris de les proves hematològiques mitjançant el càlcul de coeficients de correlació. Les poliamines van mostrar una tendència a decreixer amb la concentració d'eritròcits i d'hemoglobina en sang. En el cas de l'espermina *vs* eritròcits el coeficient de correlació va ser significatiu però el seu valor no va resultar rellevant ( $r = -0,33$ ). Aquestes tendències, junt amb els valors de PA totals en sang trobats en el grup estudiat, suggereixen l'existència d'un mecanisme homeostàtic destinat a mantenir un nombre constant de  $\mu\text{mols}$  de poliamina per litre de sang. En funció d'aquest equilibri l'organisme podria modular les concentracions intraeritrocitàries de PA.

L'espermina va aparèixer lligada de forma significativa amb el volum corpuscular mitjà dels eritròcits i de forma més potent ( $r = 0,46$ ) amb l'hemoglobina corpuscular mitjana. Aquesta relació és notable i mereix ser investigada amb més profunditat ja que aquests dos índexs de la cèl.lula vermella són molt importants en la diagnòsi diferencial de l'anèmia. La presència d'un estat anèmic en els pacients investigats pels seus valors de poliamines eritrocitàries podria amagar els canvis reals en aquests valors produïts per la pròpia malaltia, de forma que, per exemple, individus amb dèficit de vitamina B<sub>12</sub> o àcid fòlic, o individus amb una malaltia hepàtica de base amb VCM > 100 fL i HGBCM > 30 pg podrien presentar valors artificialment elevats de poliamines.

L'estudi dels valors de poliamines en sang de pacients amb la síndrome de l'intestí curt (grup II.A) va mostrar que l'espermidina estava significativament elevada en aquests pacients respecte al grup de referència. El subgrup de pacients en període d'adaptació clínica (temps des de la resecció < 3 anys) va mostrar els valors més alts d'espermidina (significatius) i d'espermina, mantenint un quocient EPD/EPM molt semblant al de les persones sanes. L'augment de la concentració d'espermidina i d'espermina en sang ha estat estudiat durant el procés de regeneració hepàtica. Els increments de PA en l'eritròcit es correlacionen amb la proliferació de l'hepatòcit després de l'hepatectomia parcial en la rata (Moulinoux *et al.* 1987). La fase inicial d'hiperplàsia es caracteritza per un increment correlacionat de les dues poliamines, seguit d'una fase d'hipertrofia on es perd aquesta correlació. Els estudis en humans, després de una hepatectomia parcial, confirmen aquestes dades (Tsukamoto *et al.* 1997). Ambdós estudis van trobar una associació significativa entre l'extensió de la resecció hepàtica i els increments d'espermidina en l'eritròcit. Els increments d'espermina, en canvi, no es van poder relacionar amb el grau de regeneració hepàtica. També, després del transplantament de medul.la òssia en humans, es va observar un augment correlacionat d'espermidina i espermina al final de la fase d'aplàsia; el qual, es va atribuir a un increment en la proliferació de la medul.la òssia (Bergeron *et al.* 1995). En aquest cas, es va poder establir un valor umbral d'espermidina en sang que assenyala el començament de l'empeltament. Aquests resultats i els obtinguts en d'altres estudis (p. ex., Moulinoux *et al.* 1984, Seghieri *et al.* 1997 o Mishra *et al.* 1997) indiquen que la mesura de l'espermidina en sang és més robusta i fàcil d'interpretar en relació als processos biològics i l'evolució clínica postquirúrgica que les concentracions d'espermina. Tsukamoto *et al.* (1997) van suggerir que els increments en les concentracions d'espermina poden estar causats per l'augment

en la concentració d'espermidina eritrocitària. Nosaltres, en canvi, pensem que els augments en l'espermina en la fase d'adaptació intestinal es poden atribuir al fenomen de la necrosi cel·lular en el teixit. Per la seva càrrega i localització nuclear, l'espermina és un metabòlit estrictament intracel·lular i la seva acumulació resulta de l'alliberament en la circulació des de cèl·lules que moren, no d'un alliberament fisiològic (Sarhan *et al.* 1991). Així doncs, les altes concentracions d'espermina en els eritròcits en els pacients en període d'adaptació intestinal podrien ser el resultat d'un període de reparació dels teixits amb un alt grau de recanvi cel·lular. En aquest sentit, cal mencionar els alts nivells de poliamines (39,7 nmol espermidina/ $10^{10}$  cèl·lules i 68,6 nmol espermina/ $10^{10}$  cèl·lules) observats en un pacient resecat que durant la fase d'adaptació va patir la formació recurrent de fístules intestinals.

En els pacients que havien superat els tres anys des de la resecció, els nivells d'espermidina es van mantenir alts, ara però, sense significació estadística. Aquesta persistència dels nivells alts d'espermidina en sang més enllà de la fase d'adaptació podria formar part de la fisiopatologia de la síndrome del budell curt. L'espermina, en canvi, va deixar d'acumular-se en la sang en els pacients adaptats i, en conseqüència, el valor del quocient EPD/EPM va ser superior en aquests pacients respecte als pacients en fase d'adaptació clínica i els subjectes normals.

Els resultats indiquen que la resecció intestinal i la síndrome de l'intestí curt modifiquen de forma consistent i mesurable les concentracions de poliamines en sang i suggereixen la possibilitat d'utilitzar les concentracions de poliamines en sang, en particular la concentració d'espermidina en els eritròcits, per fer un seguiment del procés d'adaptació del budell després de la resecció.

L'estudi de l'efecte de les poliamines en la producció de MDA en els eritròcits en el grup d'individus sans I.B aporta evidències de que l'espermina i, en menor grau, l'espermidina són compostos amb una potent activitat reductora de la peroxidació lipídica en la membrana de la cèl·lula vermella. L'acció antioxidant de les poliamines és objecte de recerca continuada ja que sembla protegir diferents biomolècules contra el dany oxidatiu. Ha *et al.* (1998) van observar com la presència d'espermina reduïa de forma específica el trencament de cadenes d'ADN superenrotllat induït per  $H_2O_2$ . L'addició de les altres dues PA, en canvi, no va tenir cap efecte. Recentment, s'ha observat que tant l'espermidina com l'espermina protegeixen de forma efectiva els enzims superòxid dismutasa i catalasa en un sistema productor del singlet d'oxigen molecular ( $^1O_2$ ) (Kim *et al.* 2001).

En el nostre treball, vam emprar les concentracions utilitzades per Ballas *et al.* (1983) en els seus estudis sobre l'efecte de les PA en la deformabilitat i l'estabilitat mecànica de les membranes eritrocitàries. Aquestes concentracions extracel·lulars eren efectives en produir una acumulació significativa, de l'ordre 1-100  $\mu M$ , dintre de la cèl·lula (en el nostre grup de població normal ( $n = 66$ ) la concentració eritrocitària mitjana calculada a partir del volum corpuscular mitjà va ser:  $22,4 \pm 5,6 \mu M$  per l'espermidina i  $16,6 \pm 9,4 \mu M$  per l'espermina). Només quan s'aconseguien variacions d'aquest ordre en les concentracions intracel·lulars, s'elicitaven els efectes de les poliamines sobre la membrana cel·lular: una reducció de la seva deformabilitat i un augment en l'estabilitat del seu esquelet fent-lo més resistent a la fragmentació. La magnitud dels efectes seguia l'ordre: espermina  $\gg$  espermidina  $>$  putrescina. En el nostre estudi aquestes mateixes

concentracions d'espermina i espermidina van produir fortes reduccions en la producció de malonildialdehid, mentre que la putrescina no va mostrar cap efecte. La dosi 500  $\mu\text{M}$  d'ambdues poliamines superiors va ser la que va produir una major inhibició de la peroxidació indicant que l'efecte antiperòxidatiu de les poliamines depèn de la seva internalització en l'eritròcit tal i com succeeix amb el seu efecte sobre la deformabilitat i l'estabilitat de la membrana. En els estudis experimentals publicats sobre l'activitat antioxidant de les poliamines s'observa com l'espermina és la PA amb major activitat contra el dany oxidatiu. De forma significativa, la revisió sobre el tema de Loovas (1997) conclou, que: "els teixits amb nivells alts d'espermina resisteixen millor l'estrès oxidatiu". Els nostres resultats aporten més evidències per reforçar aquesta idea, encara que l'explicació estructural o mecànica del fenomen continua sent desconeguda. En el cas de la protecció dels lípids de membrana s'hipotetitza que l'estructura de l'espermina li permet coordinar un major nombre de grups polars fosfolipídics, fent-los inasequibles a l'acció d'agents oxidants (Schuber 1989). El fet de que l'espermina i l'espermidina es trobin en l'eritròcit associades a proteïnes de l'esquelet de la membrana, unides als grups polars de la membrana i lliures en el citoplasma, suggereix que la seva acció antioxidant en aquestes cèl.lules podria realitzar-se a través de diferents mecanismes; això és, mitjançant la ja referida formació de complexos amb grups polars de fosfolípids (Schuber 1989), mitjançant la formació de complexos ternaris poliamina-espècie oxidant-fosfolípid (Tadolini 1988) i mitjançant la captura de radicals lliures (Drolet *et al.* 1986).

En estudiar un subgrup de quatre individus en situacions clíniques on hi ha una gran generació de radicals lliures, vam trobar que tots ells mostraven nivells molt alts de peroxidació lipídica en absència d'estimulació. L'addició d'espermina va inhibir la producció de MDA de forma molt similar a com ho havia fet en individus normals, en resposta a l'estrès induït per  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Puix que la producció espontània (sense estimulació) d'altres quantitats de MDA és indicativa d'una depleció de vitamina E en la membrana eritrocitària (Cynamon *et al.* 1985), aquests resultats semblen indicar que l'acció antiperòxidativa de les poliamines en els eritròcits és independent de l'estatus de vitamina E.

En conjunt, els resultats indiquen que l'espermina i l'espermidina mostren un efecte protector directe contra la peroxidació lipídica en l'eritròcit a concentracions fisiològicament i biològicament rellevants i, per tant, es poden considerar integrants del mecanisme de defensa passiva de l'eritròcit contra el dany oxidatiu.

## **4.2 Poliamines en l'intestí**

### **4.2.1 Poliamines en la síndrome de l'intestí curt**

El budell prim es capaç d'endegar canvis adaptatius molt notables en resposta a diferents estímuls. A nivell d'òrgan i de teixit, els canvis morfològics i funcionals, i els mecanismes que desencadenen la resposta han estat estudiats en profunditat. A nivell cel.lular, en canvi, els factors implicats en el creixement adaptatiu de la mucosa són menys coneguts. L'adaptació intestinal es

caracteritza, fonamentalment, per canvis en la velocitat de producció de les cèl·lules criptals, que resulten en una hiperplàsia (o hipoplàsia) dels villi i les criptes intestinals. La hiperplàsia, unida a la dilatació del budell, incrementa l'àrea de superfície absorbiva per unitat de longitud de l'òrgan, i això resulta en una hiperfuncionalització segmental, és a dir, augmenta la capacitat d'absorció de nutrients i l'activitat enzimàtica total per unitat de longitud (Dowling 1992).

Puix que les poliamines són essencials per a la proliferació cel·lular, el contingut en poliamines i les activitats dels enzims que controlen la seva síntesi i degradació poden reflexar els canvis adaptatius a nivell cel·lular que tenen lloc en la mucosa intestinal després de la resecció del budell. En l'estudi realitzat amb pacients SIC amb jejunostomia (grup II.B) vam observar que els nivells de poliamines i l'activitat ODC en la mucosa d'aquests pacients eren significativament inferiors als nivells normals, suggerint no només una impediment de la hiperplàsia adaptativa sinó, en realitat, una reducció en la velocitat de proliferació del teixit. El nombre de còpies d'ARNm-ODC en la mucosa jejunal també va ser significativament inferior en els pacients jejunostomitzats. Això suggereix, que, al menys en part, la disminució en la biosíntesi de PA es deu a factors que interaccionen amb la transcripció del gen *ODC* o amb l'estabilitat dels trànscrips. Existeixen uns quants reguladors transcripcionals identificats de l'*ODC*. Entre els que podrien modificar la transcripció de l'*ODC* en el budell podem citar el factor de creixement epidèrmic (Flamigni *et al.* 2001) o la histamina (Greenberg *et al.* 1985), i entre els que poden modificar l'estabilitat dels trànscrips, els andrògens (Laitinen *et al.* 1984) o l'asparagina (Chen i Chen 1992). Vam trobar una activitat DAO jejunal significativament inferior en els pacients. Aquest fet es consistent amb la idea d'un impediment o retard en la hiperplàsia de la mucosa, puix que la regeneració de la mucosa del budell prim després del dany es caracteritza per un increment progressiu de l'activitat DAO tissular (Luk *et al.* 1981). Una activitat DAO baixa en la mucosa podria constituir una resposta secundària a la falta de poliamines en el teixit, destinada a permetre incorporar putrescina d'origen alimentari o bacterià (Wollin *et al.* 1998).

Els resultats d'HPLC van evidenciar una disminució dels nivells de poliamines per proteïna soluble en els pacients, que va assolir significació estadística en el cas de l'espermina. Contràriament a les altres dues poliamines, els reservoris d'espermina dintre de la cèl·lula es mostren invariables en diferents condicions experimentals. En funció del seu confinament intracel·lular, la disminució de l'espermina es pot associar amb un decrement en la cel·lularitat de la mucosa jejunal, i això aporta una nova evidència de l'absència d'hiperplàsia en els pacients estudiats. La concentració d'ornitina en la mucosa jejunal dels pacients resecats va ser més del doble de la concentració trobada en subjectes normals. Discutir els motius que podrien explicar aquest augment queda fora de l'abast d'aquesta tesi, però aquest resultat indica que aparentment els baixos nivells de PA en el jejú dels pacients no venen determinats per una manca de substrat precursor en el teixit.

Els resultats obtinguts, en conjunt, apunten al desenvolupament d'una hipoplàsia adaptativa en l'intestí dels pacients jejunostomitzats. La hipoplàsia s'evidencia, p. ex., durant el dejú (Clarke *et al.* 1976), la nutrició parenteral total (Hughes *et al.* 1980) o en segments de budell prim exclusius per derivació (Gleeson *et al.* 1972), i consisteix en una caiguda en la velocitat de producció de cèl·lules criptals i una hipoplàsia dels villi intestinals. En aquests casos, es dona a la vegada una disminució del calibre del budell i, la reducció resultant en la superfície absorbiva condueix a una hipofuncionalització segmental. Malgrat no poder disposar de dades histològiques o

morfològiques dels nostres pacients, les dades sobre el metabolisme de les PA indiquen un descens en la proliferació cel·lular de la mucosa jejunal i són compatibles amb un alentiment del recanvi de cèl·lules criptals. En últim terme, aquestes dades suggereixen que l'intestí d'aquests pacients és hipoplàsic.

En el procés d'adaptació endegat per una resecció intestinal massiva intervenen múltiples factors. Els nutrients orals i les secrecions pancreatobiliars tenen una importància cabdal en la estimulació de la mucosa perquè aquesta esdevingui hiperplàsica. De forma secundària a aquests factors luminals, actuen tota una sèrie d'hormones com ara l'enteroglucagon, el factor del creixement epidèrmic, la prostaglandina E2 o els anàlegs de l'hormona del creixement humana per citar només unes quantes. Algunes d'elles han demostrat tenir un potent efecte sobre l'activitat ODC en cèl·lules criptals normals de rata IEC-6 i en el budell prim de diferents models animals (Wu *et al.* 2000, Fukuda *et al.* 1998, Tsuchiya *et al.* 1997, Myojo *et al.* 1997, Ulshen *et al.* 1996, Wang *et al.* 1995). Investigacions recents sobre la síndrome del budell curt revelen com les concentracions de certes hormones gastrointestinals que actuen en el jejú, però que es produeixen i secreten en cèl·lules específiques de l'íli i el colon, es redueixen dramàticament en pacients sense aquests dos òrgans. Dues d'elles han rebut creixent atenció en els últims anys: el pèptid tipus glucagon 2 ([*angl.*] glucagon-like peptide-2; GLP-2) i el pèptid tirosina-tirosina (PYY). El GLP-2 sembla estar involucrat de forma directa en l'adaptació estructural del budell, ja que promou el creixement dels villi i les criptes intestinals i incrementa la longitud i el pes del budell prim en models animals (Druker 1999). PYY, en canvi, participa exclusivament en l'adaptació funcional alentint el buidatge estomacal i el trànsit al budell prim, no obstant això, la seva acció sembla estar regulada per les poliamines ja que l'expressió del seu gen es abolida en presència de DFMO (Taylor *et al.* 1992). És probable que l'absència d'aquests i altres factors de creixement que actuen a distància en el budell jejunostomitzat condicionin el normal funcionament del cicle de les poliamines en els pacients estudiats. Futurs treballs *in vitro* i en models animals són necessaris per aclarir les relacions particulars entre factors humorals i factors de creixement locals com les poliamines en el budell, i establir la utilitat de l'administració d'hormones gastrointestinals o anàlegs seus en pacients on l'adaptació intestinal està abolida.

En resum, les dades presentades aquí proporcionen un argument sòlid des del punt de vista de la proliferació cel·lular per explicar l'absència d'evidències clíniques d'adaptació funcional o estructural en pacients amb la síndrome del budell curt amb jejunostomia. Els resultats obtinguts suggereixen també que en pacients amb jejunostomia el metabolisme de les poliamines és una diana terapèutica potencial per promoure l'adaptació estructural del budell.

## **4.2.2 Poliamines en el càncer colorectal**

Estudis previs indiquen que els teixits amb una alta demanda de poliamines, entre ells els tumors, són capaços d'incorporar de forma preferencial les poliamines distribuïdes pel sistema circulatori (Clark i Fair 1975). La putrescina i l'espermidina mereixen una atenció especial en aquest sentit, ja que són metabòlits que poden entrar i sortir de les cèl·lules amb relativa fluidesa. L'espermina, en canvi, és incorporada en quantitats relativament inferiors tant per cèl·lules normals com transformades (Bachrach i Seiler 1981) i la seva disponibilitat depèn de

L'aminopropilació de l'espermidina dintre de la cèl.lula. Els tumors colorectals es troben en una situació excepcional en quant a l'aport extracel.lular de poliamines: el quim i la llum intestinal contenen quantitats inusualment altes de putrescina que poden arribar a varis mmols per litre (Osborne i Seidel 1990, Forget *et al.* 1997). En els nostres experiments en cèl.lules CT-26 vam comprovar com l'addició de putrescina estimulava la síntesi d'ADN en forma dosi-depenent entre 0,1 i 1 mM. Estudis previs han mostrat com l'addició de putrescina incrementa la incorporació de timidina tritiada o bromodesoxiuridina en l'ADN de cèl.lules normals: hepatòcits (Nagoshi i Fujiwara 1994), miòcits (Thyberg i Fredholm 1987, Tantini *et al.* 2001), enteròcits (Ginty *et al.* 1989, Olaya *et al.* 1999), astròcits (Dot *et al.* 2002), cèl.lules endometrials (Rodríguez-Sallaberry *et al.* 2001); i cèl.lules transformades (Olaya *et al.* 1999). El nostre estudi conclou que aquest efecte també s'observa en cèl.lules de carcinoma de còlon altament metastàtiques.

En cèl.lules de carcinoma de còlon LS-123 l'efecte estimulador de la putrescina sobre la síntesi d'ADN és significativament superior al de l'espermidina (Olaya *et al.* 1999) i aquest fet introdueix un dubte raonable sobre la natura de l'efecte proliferatiu de la putrescina. En quin percentatge és atribuïble aquest efecte a la molècula mateixa de putrescina, a la seva conversió en poliamines o a la seva conversió en 4-aminobutiraldehid. La desaminació de la putrescina per generar 4-aminobutiraldehid és la primera etapa de diferents vies catabòliques que poden conduir a la producció de GABA, via aldehid deshidrogenasa [EC 1.2.1.19] (Seiler 1980), i de succinat, via GABA transaminasa [EC 2.6.1.19] i semialdehid succínic deshidrogenasa [EC 1.2.1.16] (Bardocz *et al.* 1998), entre d'altres compostos. Així doncs, a més de constituir el precursor de les poliamines, la putrescina intestinal pot ser utilitzada per sintetitzar un missatger intracel.lular o pot ser utilitzada com una font de nitrogen. La seva desaminació també produeix metabòlits com la  $\Delta^1$ -pirrolina (per ciclació espontània del 4-aminobutiraldehid) (Okuyama i Kobayashi 1961, Tamura *et al.* 1989), la 2-pirrolidona (Lundgren i Hankins 1978), 5-hidroxi-2-pirrolidona (Lundgren i Fales 1980) de funció desconeguda, i d'altres compostos no identificats (Okuyama i Kobayashi 1961, Seiler i Eichentopf 1975, Hauser i Cook 1990).

L'alta activitat DAO en el teixit intestinal va ser considerada en el passat com una barrera per les poliamines d'origen luminal (Shaff i Beaven 1976). A més, els sofisticats mecanismes enzimàtics involucrats en el control del metabolisme de les poliamines en les cèl.lules recolzaven la idea de processos regulatoris estrictament intracel.lulars. Posteriorment, ha esdevingut aparent que el control del transport és una part essencial del sistema de regulació cel.lular de poliamines (Seiler 1987).

Per examinar si la inhibició de l'activitat diamina oxidasa modificava l'efecte proliferatiu de la putrescina vam administrar aminoguanidina a cèl.lules CT-26. Els nostres resultats indiquen que aquest efecte no depèn de la conversió de putrescina en 4-aminobutiraldehid i metabòlits derivats en les cèl.lules. Per altra banda, aquest resultat no descarta un efecte proliferatiu de la putrescina en el budell via DAO, ja que el GABA produït a partir de la putrescina en cèl.lules intestinals podria actuar de forma paracrina sobre tipus cel.lulars diferents (Hardt *et al.* 2000).

En quant a les concentracions intracel.lulars de poliamines els resultats d'HPLC van mostrar una acumulació proporcional de putrescina en les cèl.lules CT-26 depenent de la concentració en el medi. Les concentracions d'espermidina, en canvi, van mostrar un augment de 2-3 vegades en les cèl.lules tractades respecte als controls i el mateix increment inespecífic es va observar en la

concentració intracel·lular d'espermina. En quant a la proliferació cel·lular, s'observa una relació lineal de la proliferació amb la putrescina acumulada, però no amb les concentracions intracel·lulars d'espermidina i espermina. Aquest resultat és remarcable perquè d'altres autors van postular una acció directa de la putrescina sobre la proliferació de cèl·lules intestinals normals IEC-6, en demostrar que l'addició de putrescina en absència de sèrum boví provoca un augment en la síntesi d'ADN sense una conversió significativa de  $^{14}\text{C}$ -putrescina en poliamines superiors o d'altres derivats (Ginty *et al.* 1989). L'addició simultània de sèrum, en un experiment paral·lel, produïa uns augments en les concentracions d'espermidina i espermina similars als trobats en CT-26. Això indica, que l'efecte tròfic del sèrum inclou l'activació dels enzims necessaris per a convertir la putrescina en les poliamines superiors, un efecte que no produeix l'addició de putrescina *per se*. L'estimulació del sèrum podria explicar els augments inespecífics d'espermidina i espermina observats en els cultius de CT-26, i això ens condueix a hipotetitzar que l'efecte proliferatiu de la putrescina exògena en cèl·lules tumorals CT-26 pot ser atribuïble a la pròpia molècula de putrescina. El mecanisme(s) molecular mitjançant el qual la putrescina produeix una resposta proliferativa està molt menys caracteritzat que en el cas de l'espermidina i l'espermina. Està descrit el seu efecte estimulador de la síntesi i l'activitat dels ribosomes que precedeix la síntesi d'ADN en *E. coli* (Kashiwagi *et al.* 1989). Experiments *in vivo* i *in vitro* en hepatòcits suggereixen que la putrescina és un comitogen del FCE. La seva presència augmenta la proliferació en cèl·lules que han entrat en la fase G1 mitjançant una interacció a nivell molecular (Nagoshi i Fujiwara 1994). Més recentment, ha estat descrit que un 20% de la putrescina addicionada a cèl·lules intestinals Caco-2 s'incorpora en el nucli cel·lular. En el cas de cèl·lules replicants, però no en cèl·lules diferenciades, gran part d'aquesta putrescina es troba unida a oligopèptids nuclears. (Pignata *et al.* 1999).

En cèl·lules CT-26 estimulades amb sèrum l'abundància d'ARNm-ODC no va mostrar diferències significatives entre cèl·lules tractades i no tractades amb putrescina. Malgrat que alguns treballs descriuen un efecte desestabilitzador de les poliamines sobre la molècula d'ARNm-ODC (Kahana i Nathans 1985), s'han estat reportat evidències en sentit contrari en cèl·lules intestinals (Ginty *et al.* 1990, Seidel i Ginty 1990) i específicament de carcinoma de còlon (Celano *et al.* 1989). La presència d'altres concentracions de poliamines en el budell implica que, molt probablement, els sistemes de transport i distribució de les poliamines exògenes en les cèl·lules intestinals tinguin un paper tant o més important que la biosíntesi endògena mitjançant descarboxilació d'ornitina en la satisfacció dels requeriments de poliamines. Persson *et al.* (1986) van concloure que els nivells de PA no modifiquen el contingut cel·lular d'ARNm-ODC.

Tampoc vam observar un efecte inhibidor de l'activitat ODC en cèl·lules CT-26 tractades amb putrescina. De fet, encara que sense significació estadística, es pot apreciar un increment progressiu d'activitat en cèl·lules tractades amb 550 i 1000  $\mu\text{M}$  respecte als controls. La putrescina exògena inhibeix l'activitat ODC en diferents línies cel·lulars per un mecanisme àmpliament caracteritzat, el qual implica un augment en la síntesi basal d'AZ i un augment en les interaccions AZ-ODC (Hayashi *et al.* 1995). Puix que els resultats d'HPLC revelen augments de 2, 3 i 4  $\times$  en la concentració intracel·lular de putrescina nosaltres hauríem esperat uns nivells d'activitat ODC cel·lular clarament inferiors als controls. En canvi, la putrescina a les dosis de treball utilitzades no modifica substancialment l'activitat ODC en CT-26, alhora que es capaç d'estimular la seva proliferació. Una situació semblant va ser descrita per Loser i col·laboradors en un model de rata



alimentada amb dieta deficient en poliamines (DDP) amb o sense suplementació en poliamines: les rates amb DDP + PA van mostrar un major pes del budell i majors continguts de proteïna i ADN en la mucosa intestinal ( $p < 0,01$ ) que les rates amb DDP sense mostrar una activitat ODC en la mucosa diferent (Loser *et al.* 1999). Degut als alts nivells de PA presents normalment a la mucosa intestinal és possible que el mecanisme de regulació de l'ODC per les PA en cèl.lules originàries d'aquest teixit no sigui tan sensible com en d'altres tipus cel.lulars. Una altra explicació més senzilla és que l'addició simultània de putrescina i sèrum fresc, un estimulador conegut de l'activitat ODC, a les cèl.lules CT-26 inhibeixi l'activació d'AZ mediada per la primera (Imanishi *et al.* 1995).

L'expressió diferencial de l'antienzim, i la seva relació amb l'ornitina descarboxilasa i la ciclina D1 es va estudiar en teixit neoplàsic colònic humà. Una primera observació rellevant és la coordinació que van mostrar els nivells d'AZ amb l'expressió i l'activitat ODC a nivell de teixit. Els nivells de proteïna AZ i l'activitat ODC semblen reproduir en el teixit, el seu comportament durant el cicle cel.lular caracteritzat per increments i decrements paral.lels durant la major part del cicle, excepte durant la fase S on l'AZ acumulat provoca una caiguda relativa d'activitat ODC (Linden *et al.* 1985). En canvi, la coordinació en la transcripció dels gens és un fet desconegut. Un dels pacients (P5) va presentar unes concentracions tumorals d'espermidina i espermina incrementades, però una disminució simultània en els nivells d'ARNm i proteïna de l'AZ associat, com en els altres casos, a l'expressió d'ODC. Aquestes observacions, en conjunt, semblen indicar l'existència de potents estímuls transcripcionals que controlen en gran mesura l'expressió coordinada d'ODC i AZ en el teixit. En el cas mencionat la inhibició de la transcripció sembla tenir més pes en la producció de proteïna AZ que un augment en els nivells de poliamines.

És un concepte acceptat que puix que l'accumulació excessiva de PA pot induir l'arrest, l'apoptosi o la necrosi cel.lular (Bonneau i Poulin 2000, Hoet i Nemery 2000), un augment en les concentracions intracel.lulars d'espermidina i espermina, i en menor mesura de putrescina, fa augmentar progressivament la síntesi de noves unitats de proteïna AZ (Matsufuji *et al.* 1995) destinades a bloquejar tant la biosíntesi com la incorporació de PA (Suzuki *et al.* 1994). En cèl.lules de carcinoma de pròstata s'ha observat que aquest circuit autorregulatori pot inactivar-se (Koike *et al.* 1999). La pròstata produeix grans quantitats d'espermina, un component normal del fluid seminal. L'addició *in vitro* d'espermina arresta en G1 el creixement de cèl.lules prostàtiques pobrement metastàtiques AT2.1, però en les mateixes condicions, cèl.lules altament metastàtiques AT3.1 eviten l'arrest del cicle cel.lular i són incapaces d'expressar AZ. Els autors van plantejar la hipòtesi de que la resistència a l'espermina en una subpoblació de cèl.lules metastàtiques podria constituir un avantatge en termes de creixement respecte a d'altres clons del tumor prostàtic i podria tenir, en conseqüència, un paper important en les últimes etapes de la progressió del tumor. En les nostres observacions, el tumor de P5 mostra: (a) el doble de PA que la mucosa colònica sana però nivells inferiors de proteïna AZ; (b) una expressió disminuïda d'ODC suggerint que les PA del teixit són majoritàriament de procedència exògena i (c) un comportament extremadament agressiu amb una recidiva molt precoç. Aquestes característiques del tumor són consistents amb la hipòtesi de Koike *et al.* (1999) i suggereixen que la inactivació de l'AZ també pugui ser una via de progressió tumoral en el càncer colorectal. El coneixement que

tenim avui dia sobre com estan integrades la regulació de l'ODC i la regulació dels sistemes d'incorporació de PA a les cèl·lules fa difícil especular sobre el mecanisme involucrat en la falta de resposta d'AZ. Malgrat això, la coordinació entre l'expressió d'ODC i AZ en P5 suggereix que aquest mecanisme no seria de tipus directe, per exemple, mitjançant una mutació en la seqüència d'AZ, sinó que podria implicar la participació d'altres factors reguladors.

Comparats amb el teixit sà adjacent, els tumors primaris van exhibir uns nivells superiors ARNm-AZ i ARNm-ODC en tres casos de tumor no invasiu i uns nivells inferiors en dos casos de tumor metastàtic. Particularment, el pacient P4 el teixit del tumor primari mostrava: concentracions reduïdes de les tres PA, expressió inferior d'AZ, nivells d'ARNm-ODC gairebé indetectables i una activitat ODC baixa. Diversos estudis han documentat una expressió incrementada d'ODC en teixit de neoplàsies colorectals *vs.* la mucosa d'aspecte normal (Porter *et al.* 1987, Linsalata *et al.* 1993, Matsubara *et al.* 1995). No obstant, les activitats ODC reportades mostren habitualment gran variabilitat en teixit neoplàsic, i mai s'ha demostrat una correlació amb la diferenciació histològica o l'estadi dels tumors. P4 i P5 podrien representar dos tipus de tumor metastàtic on la progressió del càncer ha seguit vies moleculars diferents. El fet que l'expressió tumoral de la ciclina D1 sigui completament diferent en aquest dos pacients és una evidència més en favor d'aquesta hipòtesi. La sobreexpressió o acumulació de proteïna ciclina D1 trobada en P4 juntament amb un decrement de PA i AZ, contrasta amb una inhibició de ciclina D1 i AZ amb nivells incrementats de PA.

El gen de la ciclina D1 forma part d'un amplicon del cromosoma 11q13 que està involucrat en la patogènesi molecular de varis tumors sòlids (Bartkova *et al.* 1994). En el cas dels tumors de còlon l'amplificació de *D1* mostra freqüències excepcionalment baixes, però, en canvi, la sobreexpressió de la proteïna és observable en un 30% dels casos (Arber *et al.* 1996). Tal i com s'ha mencionat a la introducció, l'estudi de Mosbascher *et al.* (2000) amb cèl·lules de carcinoma prostàtic suggereix que l'AZ pot regular els nivells de proteïnes ciclina D1 i cdk-4 a través d'un marcatge per degradació proteosomal. Entre els tumors de còlon estudiats 2/5 acumulen la ciclina D1, però la seva expressió sembla no tenir cap relació amb l'expressió d'AZ. Per altra banda, els tumors de P1-P3 van mostrar certes característiques homogènies com el seu estadi, permeació venosa i limfàtica, nivells de PA, ODC i AZ, però de nou l'expressió de la ciclina D1 mostra resultats contradictoris. Totes les combinacions en l'expressió d'AZ i ciclina D1 són possibles i, en conseqüència, una expressió coordinada, similar a l'observada entre l'AZ i l'ODC, sembla no tenir lloc en els tumors de còlon. Si considerem que la interacció AZ-ciclina D1 reportada per Mosbascher *et al.* (2000) pot donar-se també en el còlon, els nostres resultats suggereixen l'existència de factors reguladors de l'expressió de la ciclina D1 qualitativament més potents que l'antiensim en aquest teixit.

En el grup d'estudi III.B la mitjana dels valors d'ARNm-ODC en els tumors va ser superior a la de la mucosa colònica normal. La possible existència de dos subgrups amb valors d'ARNm-ODC (*n*) al voltant de 100 còpies i 600-1100, i la correlació lineal entre la transcripció d'ODC en el teixit sà i el tumoral semblen reforçar la idea que en el desenvolupament d'alguns tumors colorectals existeix una "activació" generalitzada de tot el còlon, suggerida a partir d'estudis de proliferació cel·lular (Deschner i Maskens 1982, Terpstra *et al.* 1987) i d'activitat ODC (Porter *et*

*al.* 1987, McGarrity *et al.* 1990). Aquesta hipòtesi mereix ser investigada en un grup més gran de pacients perquè, si es confirmés, permetria identificar aquests tipus de neoplàsies en estadis inicials en les sigmoidoscòpies de rutina que es realitzen en grups de risc. Cap de les altres variables estudiades: diferenciació, estadi del tumor, marcadors plasmàtics o edat va presentar uns valors distintius en els pacients amb alts nivells de transcripció ODC, fent difícil interpretar que diferència aquests tumors de la resta.

Tres dels pacients estudiats van mostrar una transcripció d'ODC molt semblant en tumor i teixit sà. Tal i com succeeix amb l'activitat de l'enzim, la sobretranscripció tissular d'ODC no sembla ser una condició necessària en el desenvolupament dels tumors colorectal. Però en canvi, aquests pacients presentaven tumors amb forts augments en les concentracions de PA i estadis clinicopatològics semblants a la resta dels tumors estudiats. Això suggereix que aquests tumors podrien satisfer els seus requeriments de PA sobreexpressant els sistemes d'incorporació cel.lular de PA i, en conseqüència, serien resistents a l'acció antitumoral de DFMO. Els resultats de l'anàlisi comatogràfica semblen reforçar aquesta idea. Tal i com s'ha observat en d'altres estudis, els valors mitjans de les concentracions de PA en els tumors colorectals van ser superiors als de la mucosa no afectada. (LaMuraglia *et al.* 1985, Upp *et al.* 1987, Porter *et al.* 1987, McGarrity *et al.* 1990, Berdinskikh *et al.* 1991). Un percentatge majoritari d'aquests tumors sintetitza i/o incorpora un excés de PA durant el seu desenvolupament. En el nostre estudi, els tumors van mostrar en promig un contingut significativament superior de putrescina i espermidina no associats amb la transcripció d'ODC. Particularment, la concentració de putrescina en la mucosa del còlon ha estat proposada prèviament com a marcador discriminant de la presència de pòlips adenomatosos en població de risc (McGarrity *et al.* 1990) i de mutacions associades a poliposi adenomatosa familiar en membres asimptomàtics (Giardello *et al.* 1997). En analitzar conjuntament putrescina i ODC en els teixits Giardello *et al.* (1997) tampoc van trobar una associació entre els augment significatius de la primera i l'activitat enzimàtica del segon.

El quocient EPD/EPM en la mucosa sana, en canvi, sí que va mostrar un associació significativa consistent amb els nivells de transcripció d'ODC, la qual es perd en el teixit tumoral. Aquest quocient es considera un índex de proliferació cel.lular i és, a la vegada, la mesura més reproducible del metabolisme de PA en la mucosa colorectal (Hixson *et al.* 1994). Durant el creixement normal de la mucosa colònica la concentració efectiva de les PA està subjecta a una forta i complexa regulació per multitud de factors. La dissociació de la transcripció de l'ODC i el quocient EPD/EPM suggereix un fenomen de desregulació en el creixement, i podria ser rellevant en l'estudi dels canvis fenotípics dels colonòcits durant la transformació i la progressió tumoral.

En funció de la relació ARNm-ODC/PA tres patrons de tumor colorectal semblen aparents: aquells que no mostren un contingut de PA superior al de la mucosa normal, aquells que incrementen els seu nivells mitjançant la sobreexpressió de l'ODC i aquells que acumulen PA activant, presumiblement, els mecanismes d'incorporació cel.lular. Els pacients on la mucosa sana expressa massivament transcrits d'ODC han de ser estudiats més en profunditat considerant la possibilitat de que això impliqui un risc cert de carcinogènesi colorectal. En aquest sentit, serà necessari obtenir dades dels nivells basals de transcripció ODC en la mucosa colorectal humana de la població en general i de grups de risc baix i alt. A nivell molecular serà necessari aprofundir

en el coneixement dels mecanismes que permeten a un percentatge dels tumors acumular poliamines sense canvis en la transcripció i l'activitat de l'ODC.

### **4.3 Activitat ODC dels mutants A88D, S274R i A88D/S274R AZI**

Cap de les tres proteïnes recombinants purificades, A88D, S274R o A88D/S274R AZI va mostrar activitat ornitina descarboxilasa. L'explicació més probable per aquest resultat és que, a més dels dos residus estudiats, existeixen altres residus imprescindibles per l'activitat catalítica del dímer ODC, els quals són absents en l'AZI i encara no han estat descrits. En aquest sentit, la recent resolució de l'estructura de raigs X de tres ODCs eucariotes (ratolí, tripanosoma i finalment la humana), permet identificar nous residus estrictament conservats en el nucli arquitectònic del centre actiu de l'enzim que poden estar involucrats en la catàlisi i/o la unió del substrat: R154, Y323, D332, Y389 i N398. L'AZI no conté tres d'aquest residus: R154, D332 i Y389. L'estructura cristal·lina de l'ODC de ratolí també suggereix que un apilament d'aminoàcids aromàtics format per F397, Y323 i Y331' pot estar involucrat en l'estabilització del dímer mitjançant la formació d'interaccions primàries entre subunitats de l'ODC (Kern *et al.* 1999). En l'AZI, la tirosina Y331 es substituïda per un residu molt més petit, una serina. Puix que els centres actius de l'enzim depenen de la correcta orientació dels dos monòmers és raonable pensar que aquesta substitució pugui alterar l'activitat enzimàtica. En qualsevol cas, estudis bioquímics són necessaris per demostrar el caràcter essencial d'aquests residus.

Finalment, és probable que canvis en residus que aparentment semblen no estar en una posició d'influir la unió del substrat provoquin alteracions en l'especificitat de substrat de l'enzim. Yano *et al.* (1998) van modificar l'especificitat de substrat de l'aspartat aminotransferasa, un enzim relacionat estructuralment amb els ODC bacterians (Momany *et al.* 1995), i van identificar sis residus que contribuïen a aquest canvi. Sorprenentment, només un d'aquests residus es trobava a una distància que permetés una interacció directa amb el substrat; la resta estaven situats molt més lluny, un d'ells a una distància  $>10 \text{ \AA}$  respecte el lloc d'unió del substrat.



## Conclusions

1. Els resultats de PA en eritròcits de subjectes sans han estat establerts com a dades de referència per comparar els perfils de PA en diferents condicions de malaltia i per evaluar l'efecte de diferents estímuls fisiològics. S'han demostrat increments en els nivells d'espermidina eritrocitària en pacients amb la SIC en comparació amb subjectes sans que poden ser útils en l'estudi i seguiment del procés d'adaptació del budell després de la resecció.
2. L'espermina i l'espermidina mostren un efecte protector directe contra la peroxidació lipídica en l'eritròcit a concentracions fisiològicament i biològicament rellevants i, per tant, es poden considerar integrants del mecanisme de defensa passiva de l'eritròcit contra el dany oxidatiu.
3. Les dades sobre el metabolisme de les PA indiquen un descens en la proliferació cel·lular de la mucosa jejunal en pacients jejustomitzats amb la SIC. Considerant l'alt ritme de proliferació que caracteritza aquest teixit, això suggereix un alentiment en el recanvi de cèl·lules criptals i, en últim terme, una hipoplàsia intestinal; proporcionant així, una explicació per l'absència d'evidències clíniques d'adaptació funcional o estructural en aquests pacients.
4. Concentracions fisiològiques de putrescina promouen la proliferació de cèl·lules metastàtiques CT-26. Puix que la inhibició de l'activitat DAO no modifica aquest efecte i les concentracions d'espermidina i espermina no augmenten de forma paral·lela a la putrescina i la síntesi d'ADN intracel·lulars, l'efecte proliferatiu podria atribuir-se a una acció directa de la putrescina.
5. L'AZ i l'ODC mostren una expressió molt coordinada, controlada, presumiblement, per potents estímuls transcripcionals en els tumors colorectals. Un dels casos estudiats suggereix la possibilitat que la progressió tumoral per inactivació de l'AZ es doni en el càncer de còlon. La ciclina D1 no mostra una coordinació amb l'AZ similar a l'observada entre l'ODC i l'AZ en els tumors colorectals.
6. Dos subgrups de pacients de càncer colorectal es poden distingir pel nombre de còpies d'ARNm-ODC en la mucosa colònica. El grup amb valors més grans podria ser un grup de pacients amb una "activació" de tot el còlon, susceptible d'identificació preventiva en biòpsies de sigmoidoscòpia. Alguns tumors colorectals incrementen considerablement el seu contingut en PA a través de sistemes alternatius a la sobreexpressió d'ODC. L'ARNm-ODC i EPD/EPM presenten una relació lineal en mucosa colònica sana que queda desregulada en els tumors.
7. Els mutants A88D, S274R i A88D/S274R de l'inhibidor de l'antienzim no presenten activitat ornitina descarboxilasa.

# 5 Bibliografia

## 5 Bibliografia

Abeloff MD, Rosen ST, Luk GD, Baylin SB, Zeltzman M i Sjoerdsma A (1986). Phase II trials of alpha-difluoromethylornithine, an inhibitor of polyamine synthesis, in advanced small cell lung cancer and colon cancer. *Cancer Treat Rep* 70(7):843-845.

Abrahamsen MS, Li RS, Dietrich-Goetz W i Morris DR (1992). Multiple DNA elements responsible for transcriptional regulation of the ornithine decarboxylase gene by protein kinase A. *J Biol Chem* 267(26):18866-18873.

al-Asadi R, Yi EC i Merchant JL (1995). Sp1 affinity for GC-rich elements correlates with ornithine decarboxylase promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun* 214(2):324-330.

Alhonen L, Halmekytö M, Kosma VM, Wahlfors J, Kauppinen R i Jänne J (1995). Life-long over-expression of ornithine decarboxylase (ODC) gene in transgenic mice does not lead to generally enhanced tumorigenesis or neuronal degeneration. *Int J Cancer* 63(3):402-404.

Alhonen L, Parkkinen JJ, Keinänen T, Sinervirta R, Herzig KH i Jänne J (2000). Activation of polyamine catabolism in transgenic rats induces acute pancreatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(15):8290-8295.

Allen JC, Smith CJ, Hussain JI, Thomas JM i Gaugas JM (1979). Inhibition of lymphocyte proliferation by polyamines requires ruminant-plasma polyamine oxidase. *Eur J Biochem* 102:153-158.

Almud JJ, Oliveira MA, Kern AD, Grishin NV, Phillips MA i Hackert ML (2000). Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *J Mol Biol* 295(1):7-16.

Arber N, Hibshoosh H, Moss SF, Sutter T, Zhang Y, Begg M, Wang S, Weinstein IB i Holt PR (1996). Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* 110:669-674.

Ask A, Persson L, Rehnholm A, Frostesjo L, Holm I i Heby O (1993). Development of resistance to hydroxyurea during treatment of human myelogenous leukemia K562 cells with alpha-difluoromethylornithine as a result of coamplification of genes for ornithine decarboxylase and ribonucleotide reductase R2 subunit. *Cancer Res* 53(21):5262-5268.

Aubel C, Chabanon H, Persson L, Thiman L, Ferrara M i Brachet P (1999). Antizyme-dependent and -independent mechanisms are responsible for increased spermidine transport in amino acid -restricted human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 256(3):646-651.

Auvinen M, Paasinen A, Andersson LC i Hölttä E (1992). Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 360(6402):355-358.

Auvinen M, Laine A, Paasinen-Sohns A, Kangas A, Kangas L, Saksela O, Andersson LC i Hölttä E (1997). Human ornithine decarboxylase-overproducing NIH3T3 cells induce rapidly growing, highly vascularized tumors in nude mice. *Cancer Res* 57(14):3016-3025.

**B**achrach U i Seiler N (1981). Formation of acetylpolyamines and putrescine from spermidine by normal and transformed chick embryo fibroblasts. *Cancer Res* 41(3):1205-1208.

Bai G, Kasper S, Matusik RJ, Rennie PS, Moshier JA i Krongrad A (1998). Androgen regulation of the human ornithine decarboxylase promoter in prostate cancer cells. *J Androl* 19(2):127-135.

Ballas SK, Mohandas N, Marton LJ i Shohet SB (1983). Stabilization of erythrocyte membranes by polyamines. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4942-1946.

Bancroft D, Williams LD, Rich A i Egli M (1994). The low-temperature crystal structure of the pure-spermine form of Z-DNABiochemistry 33:1073-1086.

Bardocz S, Grant G, Brown DS i Pusztai A (1998). Putrescine as a source of instant energy in the small intestine of the rat. *Gut* 42(1):24-28.

Bardsley WG, Crabbe MJ, Scott IV (1974). A method for determining diamine oxidase (histaminase) in biological fluids. *Biochem Med* 11(2):138-146.

Bartkova J, Lukas J, Muller H, Lutzhoft D, Strauss M i Bartek J (1994). Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Can* 57:353-361.

Basu HS, Sturkenboom MC, Delcros JG, Csokan PP, Szollosi J, Feuerstein BG i Marton, LJ (1992). Effect of polyamine depletion on chromatin structure in U-87 MG human brain tumour cells. *Biochem J* 282(Pt 3):723-727.

Bello-Fernandez C, Packham G i Cleveland JL (1993). The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(16):7804-7808.

Berdinskikh NK, Ignatenko NA, Zaletok SP, Ganina KP i Chorniy VA (1991). Ornithine decarboxylase activity and polyamine content in adenocarcinomas of human stomach and large intestine. *Int J Cancer* 47(4):496-498.

Berger FG, Szymanski P, Read E i Watson G (1984). Androgen-regulated ornithine decarboxylase mRNAs of mouse kidney. *J Biol Chem* 259(12): 7941-7946.

Berger FG i Porter CW (1986). Putrescine does not mediate the androgen-response in mouse kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 138(2):771-777.

Bergeron C, Bouet F, Quemener V, Havouis R, Martin LA, Le Gall E i Moulinoux JP (1989). Clinical importance of erythrocyte polyamine level determination during bone marrow transplantation in children. *Anticancer Res* 9(6):1757-1760.

Bergeron C, Le Moine P, Le Berre C, Bansard JY, Martin LA, Goasguen J, Quemener V, Moulinoux JP i Le Gall E (1995). Erythrocyte polyamine levels: an indication



of successful engraftment of bone marrow in children. *Bone Marrow Transplant* 16(1):27-30.

Bergeron C, Bansard JY, Le Moine P, Bouet F, Goasguen JE, Moulinoux JP, Le Gall E, Catros-Quemener V (1997). Erythrocyte spermine levels: a prognostic parameter in childhood common acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 11:31-36.

Bickers DR i Athar M (2001). Novel approaches to chemoprevention of skin cancer. *J Dermatol* 27:691-695.

Bieganski T, Kusche J, Lorenz W, Hesterberg R, Stahlknecht CD i Feussner KD (1983). Distribution and properties of human intestinal diamine oxidase and its relevance for the histamine catabolism. *Biochim Biophys Acta* 756(2):196-203.

Biol-N'Garagba MC, Greco S, George P, Hugueny I i Louisot P (2002). Polyamine participation in the maturation of glycoprotein fucosylation, but not sialylation, in rat small intestine. *Pediatr Res* 51(5):625-634.

Black AR, Black J i Azizkhan-Clifford J (2001). Sp1 and Krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 188:143-160.

Blackshear PJ, Nemenoff RA, Hovis JG, Halsey DL, Stumpo DJ i Huang JK (1987). Insulin action in normal and protein kinase C-deficient rat hepatoma cells. Effects on protein phosphorylation, protein kinase activities, and ornithine decarboxylase activities and messenger ribonucleic acid levels. *Mol Endocrinol* 1(1):44-52.

Bolufer P, Sanz GF, Barragan E, Sanz MA, Cervera J i Lerma E (2000). Rapid quantitative detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients by real-time reverse transcriptase polymerase-chain reaction using fluorescently labeled probes. *Haematologica* 85:1248-1254.

Bonneau MJ i Poulin R (2000). Spermine oxidation leads to necrosis with plasma membrane phosphatidylserine redistribution in mouse leukemia cells. *Exp Cell Res* 259(1):23-34.

Brabant M, McConlogue L, van Daalen Wetters T i Coffino P (1988). Mouse ornithine decarboxylase gene: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(7):2200-2204.

Boettcher A (1865). Farblose Krystalle eines eiweissartigen Körpers aus dem menschlichen Sperma dargestellt. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 32:525-535.

Brattain MG, Strobel-Stevens J, Fine D, Webb M, Sarrif AM (1980). Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res* 40:2142-2146.

Bratton DL (1994). Polyamine inhibition of transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in the erythrocyte ghost. *J Biol Chem* 269(36):22517-22523.

Braverman DZ, Stankiewicz H, Goldstein R, Patz JK, Morali GA i Jacobsohn WZ (1990). Ornithine decarboxylase: an unreliable marker for the identification of population groups at risk for colonic neoplasia. *Am J Gastroenterol* 85(6):723-6.

Brieger I (1879). Über die aromatischen Produkte der Faulniss aus Eiweiss. Z Physiol Chem iii:134-148.

Brunton VG, Grant MH i Wallace HM (1991). Mechanisms of spermine toxicity in baby-hamster kidney (BHK) cells. The role of amine oxidases and oxidative stress. Biochem J 280(Pt 1):193-198.

Buchman AL i Sellin J (2001). Clinical Management of Short-Bowel Syndrome. En: Bayless TM i Hanauer SB. Advanced Therapy of Inflammatory Bowel Disease. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc. Pàg:479-484.

**C**Carbone PP, Douglas JA, Larson PO, Verma AK, Blair IA, Pomplun M i Tutsch KD (1998). Phase I chemoprevention study of piroxicam and alpha-difluoromethylornithine. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 7(10):907-912.

Catros-Quemener V, Leray G, Moulinoux JP, Havouis R, de Certaines JD i Chapman J (1997). Tumour growth modifies intravascular polyamine transport by plasma lipoproteins in the mouse. Biochim Biophys Acta 1346(1):30-37.

Celano P, Baylin SB i Casero RA (1989). Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. J Biol Chem 264:8922-8927.

Chabanon H, Persson L, Wallace HM, Ferrara M i Brachet P (2000). Increased translation efficiency and antizyme-dependent stabilization of ornithine decarboxylase in amino acid-supplemented human colon adenocarcinoma cells, caco-2. Biochem J 348(Pt 2):401-408.

Charcot JM i Robin CP (1853). Observation de leucocythémie. C R Soc Biol (Paris) 5:44-50.

Chen ZP i Chen KY (1991). Differentiation of a mouse neuroblastoma variant cell line whose ornithine decarboxylase gene has been amplified. Biochim Biophys Acta 1133(1):1-8.

Chen ZP i Chen KY (1992). Mechanism of regulation of ornithine decarboxylase gene expression by asparagine in a variant mouse neuroblastoma cell line. J Biol Chem 267(10):6946-6951.

Chomczynski P i Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156-159.

Chung DH, Evers BM, Townsend CM Jr, Huang KF, Herndon DN i Thompson JC (1993). Role of polyamine biosynthesis during gut mucosal adaptation after burn injury. Am J Surg 165(1):144-149.

Cipolla B, Moulinoux JP, Quemener V, Havouis R, Martin LA, Guille F i Lobel B (1990). Erythrocyte polyamine levels in human prostatic carcinoma. J Urol 144(5):1164-1166.

Cipolla BG, Ziade J, Bansard JY, Moulinoux JP, Staerman F, Quemener V, Lobel B i Guille F (1996). Pretherapeutic erythrocyte polyamine spermine levels discriminate high risk relapsing patients with M1 prostate carcinoma. Cancer 78(5):1055-1065.

Clifford A, Morgan D, Yuspa SH, Soler AP i Gilmour S (1995). Role of ornithine decarboxylase in epidermal tumorigenesis. *Cancer Res* 55(8):1680-1686.

Clark RB i Fair WR (1975). The selective in vivo incorporation and metabolism of radioactive putrescine in the adult male rat. *J Nucl Med* 16(5):337-342.

Clarke RM, Ecknauer R i Feyerabend G (1976). Analysis of the effects of food and of digestive secretions on the small intestine of the rat. Mucosal morphology and epithelial replacement. *Gut* 17:895-899.

Cocuzzi E, Piacentini M, Beninati S i Chung SI (1990). Post-translational modification of apolipoprotein B by transglutaminases. *Biochem J* 265(3):707-713.

Cohen LF, Lundgren DW i Farrell PM (1976). Distribution of spermidine and spermine in blood from cystic fibrosis patients and control subjects. *Blood* 48:469-475.

Cohen SA i Michaud DP (1993). Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 211(2):279-287.

Coleman CS, Stanley BA i Pegg AE (1993). Effect of mutations at active site residues on the activity of ornithine decarboxylase and its inhibition by active site-directed irreversible inhibitors. *J Biol Chem* 268(33): 24572-24579.

Coleman CS, Stanley BA, Viswanath R i Pegg AE (1994). Rapid exchange of subunits of mammalian ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 269(5):3155-3158.

Cooper KD, Shukla JB i Rennert OM (1976). Polyamine distribution in cellular compartments of blood and in aging erythrocytes. *Clin Chim Acta* 73(1):71-88.

Coulombe B (1999). DNA wrapping in transcription initiation by RNA polymerase II. *Biochem Cell Biol* 77:257-264.

Cox DR, Trouillot T, Ashley PL, Brabant M & Coffino P (1988). A functional mouse ornithine decarboxylase gene (*Odc*) maps to chromosome 12: further evidence of homoeology between mouse chromosome 12 and the short arm of human chromosome 2. *Cytogenet Cell Genet* 48(2):92-94.

Creaven PJ, Perez R, Pendyala L, Meropol NJ, Loewen G, Levine E, Berghorn E i Raghavan D (1997). Unusual central nervous system toxicity in a phase I study of N1N11 diethylnorspermine in patients with advanced malignancy. *Invest New Drugs* 15(3):227-234.

Cynamon HA, Isenberg JN i Nguyen CH (1985). Erythrocyte malonildialdehyde release in vitro: a functional measurement of vitamin E status. *Clin Chim Acta* 151:169-171.

Czernichow B, Nsi-Emvo E, Galluser M, Gosse F i Raul F (1997). Enteral supplementation with ornithine alpha ketoglutarate improves the early adaptive response to resection. *Gut* 40(1):67-72.

**D**alla Via L, Di Noto V i Toninello A (1999). Binding of spermidine and putrescine to energized liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 365(2):231-238.

- Davis RH, Morris DR i Coffino P (1992). Sequestered end products and enzyme regulation: the case of ornithine decarboxylase. *Microbiol Rev* 56(2):280-290.
- Delcros JG, Roch AM, Thomas V, el Alaoui S, Moulinoux JP i Quash G (1987). Demonstration of polyamines bound to plasma proteins during tumor growth. *C R Acad Sci III* 305(12):465-470.
- Delcros JG, Schwartz B, Clement S, Basu HS, Marton LJ i Feuerstein BG (1995). Spermine induces haemoglobin synthesis in murine erythroleukaemia cells. *Biochem J* 309(Pt3):781-786.
- Della Ragione F i Pegg AE (1984). Calderara i Bachrach (eds.). *Advances in Polyamines in Biochemical Sciences CLUEB*. Bologna. 97-104.
- Donato NJ, Rotbein J I Rosenblum MG (1991). Tumor necrosis factor stimulates ornithine decarboxylase activity in human fibroblasts and tumor target cells. *J Cell Biochem* 46(1):69-77.
- Deng H, Bloomfield VA, Benevides JM i Thomas GJ Jr (2000). Structural basis of polyamine-DNA recognition: spermidine and spermine interactions with genomic B-DNAs of different GC content probed by Raman spectroscopy. *Nucleic Acids Res* 28(17):3379-3385.
- Deschner EE i Maskens AP (1982). Significance of the labeling index and labeling distribution as kinetics parameters in colorectal mucosa of cancer patients and DMH treated animals. *Cancer* 50:1136-1141.
- Desiderio MA, Grassilli E, Bellesia E, Salomoni P i Franceschi C (1995). Involvement of ornithine decarboxylase and polyamines in glucocorticoid-induced apoptosis of rat thymocytes. *Cell Growth Differ* 6(5):505-513.
- Desiderio MA, Dansi P, Tacchini L i Bernelli-Zazzera A (1999). Influence of polyamines on DNA binding of heat shock and activator protein 1 transcription factors induced by heat shock. *FEBS Lett* 455(1-2):149-153.
- Dorhout B, van Faassen A, van Beusekom CM, Kingma AW, de Hoog E, Nagel GT, Karrenbeld A, Boersma ER i Muskiet FA (1997). Oral administration of deuterium-labelled polyamines to sucking rat pups: luminal uptake, metabolic fate and effects on gastrointestinal maturation. *Br J Nutr* 78(4):639-654.
- Dot J, Danchev N, Blanco I i Rodriguez-Alvarez J (2002). Polyamine uptake is necessary for a normal biochemical maturation of astrocytes in culture. *Neuroreport* 13(8):1083-1087.
- Dowling RH (1990). Polyamines in Intestinal Adaptation and Disease. *Digestion* 46(suppl 2):331-344.
- Dowling RH (1992). Cellular and molecular basis of intestinal and pancreatic adaptation. *Scand J Gastroenterol* 193:64-67.
- Drolet G, Dumbroff EB, Legge RL i Thompson JE (1986). Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* 25:367-371.
- Druker DJ (1999). Glucagon-like peptide-2. *Trends Endocrinol Metab* 10:153-156.
- Dudley HW, Rosenheim O i Starling WW (1926). The chemical constitution of spermine. III. Structure and synthesis. *Biochem J* 20:1082-1094.

Dudley HW, Rosenheim O i Starling, WW (1927). The constitution of spermidine, a newly discovered base isolated from animal tissues. *Biochem J* 21:97-103.

Durantón B, Nsi-Emvo E, Schleiffer R, Gosse F, Galluser M i Raul F (1997). Suppression of preneoplastic changes in the intestine of rats fed low levels of polyamines. *Cancer Res* 57(4):573-575.

**E**arnshaw DJ i Gait MJ (1998). Hairpin ribozyme cleavage catalyzed by aminoglycoside antibiotics and the polyamine spermine in the absence of metal ions. *Nucleic Acids Res* 26(24):5551-61.

Einarsson S, Josefsson B, Moller P i Sanchez D. Separation of amino acid enantiomers and chiral amines using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate and reversed-phase liquid chromatography. *Anal Chem.* 1987 Apr 15;59(8):1191-5.

Els T, Bruckmann J, Rohn G, Daffertshofer M, Monting JS, Ernestus RI i Hennerici M (2001). Spermidine: A predictor for neurological outcome and infarct size in focal cerebral ischemia? *Stroke* 32(1):43-46.

Elworthy P i Hitchcock E (1989). Polyamine levels in red blood cells from patient groups of different sex and age. *Biochim Biophys Acta* 993(2-3):212-216.

Emig M, SauBele S, Wittor H, WeiBer A, Reiter A, Willer A, Berger U, Helmann R, Cross NCP i Hochhaus A. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia* 13:1825-1832.

Erdman SH, Park JH, Thompson JS, Grandjean CJ, Hart MH i Vanderhoof JA (1989). Suppression of diamine oxidase activity enhances postresection ileal proliferation in the rat. *Gastroenterology* 96(6):1533-1538.

Erdman SH. (1990) Effects of starvation and difluoromethylornithine (DFMO) on diamine oxidase activity in rat ileum. *Digestion* 46:396-402.

Erdman SH, Ignatenko NA, Powell MB, Blohm-Mangone KA, Holubec H, Guillen-Rodriguez JM i Gerner EW (1999). APC-dependent changes in expression of genes influencing polyamine metabolism, and consequences for gastrointestinal carcinogenesis, in the Min mouse. *Carcinogenesis* 20(9):1709-1713.

**F**arriol M, Segovia-Silvestre T, Castellanos JM, Venereo Y i Orta X (2001). Role of putrescine in cell proliferation in a colon carcinoma cell line. *Nutrition* 17(11-12):934-938.

Farriol M, Segovia-Silvestre T, Venereo Y, Orta X. Antioxidant effect of polyamines on erythrocyte cell membrane lipoperoxidation after free-radical damage. *Phytoterapy Research. En premsa.*

Feinstein SC, Dana SL, McConlogue L, Shooter EM i Coffino P (1985). Nerve growth factor rapidly induces ornithine decarboxylase mRNA in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(17):5761-5765.

Feith DJ, Shantz LM i Pegg AE (2001). Targeted antizyme expression in the skin of transgenic mice reduces tumor promotor induction of ornithine decarboxylase and decreases sensitivity to chemical carcinogenesis. *Cancer Res* 61:6073-6081.

Feuerstein BG, Pattabiraman N i Marton LJ (1986). Spermine-DNA interactions: a theoretical study. *Proc Natl Acad Sci* 83:5948-5952.

Feuerstein BG, Pattabiraman N i Marton LJ (1989). Molecular dynamics of spermine-DNA interactions: sequence specificity and DNA bending for a simple ligand. *Nucleic Acids Res* 17(17):6883-6892.

Feuerstein BG, Pattabiraman N i Marton LJ (1990). Molecular mechanics of the interaction of spermine with DNA: DNA bending as a result of ligand binding. *Nucleic Acids Res* 18(5):1271-1282.

Feuerstein BG, Williams LD, Basu, HS i Marton LJ (1991). Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions. *J Cell Biochem* 46(1):37-47.

Flamigni F, Facchini A, Giordano E, Tantini B i Stefanelli C (2001). Signaling pathways leading to the induction of ornithine decarboxylase: opposite effects of p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and p38 MAPK inhibitors. *Biochem Pharmacol* 61(1):25-32.

Fogel WA, Bieganski T, Schayer RW i Maslinski C (1981). Involvement of diamine oxidase in catabolism of 14C-putrescine in mice in vivo with special reference to the formation of gamma-aminobutyric acid. *Agents Actions* 11(6-7):679-684.

Fogh J, Wright WC i Loveless JD (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58(2):209-214.

Fong WF, Heller JS i Canellakis ES (1976). The appearance of an ornithine decarboxylase inhibitory protein upon addition of putrescine to cell cultures. *Biochim Biophys Acta* 428:456-465.

Forget P, Sinaasappel M, Bouquet J, Deutz NE i Smeets C (1997). Fecal polyamine concentration in children with and without nutrient malabsorption. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24(3):285-288.

Fredlund JO i Oredsson SM (1996a). Impairment of DNA replication within one cell cycle after seeding of cells in the presence of a polyamine-biosynthesis inhibitor. *Eur J Biochem* 237(3):539-544.

Fredlund JO i Oredsson SM (1996b). Normal G1/S transition and prolonged S phase within one cell cycle after seeding cells in the presence of an ornithine decarboxylase inhibitor. *Cell Prolif* 29(8):457-466.

Freshney RI (1992). *Capitol 18. Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 3a ed. Wiley-Liss New York, USA.

Fujita K, Murakami Y i Hayashi S (1982). A macromolecular inhibitor of the antizyme to ornithine decarboxylase. *Biochem J* 204:647-652.

Fukuda M, Fujiyama Y, Sasaki M, Andoh A, Bamba T i Fushiki T (1998). Monitor peptide (rat pancreatic secretory trypsin inhibitor) directly stimulates the proliferation of the nontransformed intestinal epithelial cell line, IEC-6. *Digestion* 59:326-330.

Fukumoto GH, Byus CV (1996). A kinetic characterization of putrescine and spermidine uptake and export in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1282(1):48-56.

- Gahl WA i Pitot HC (1979). Putrescine-oxidase activity in adult bovine serum and fetal bovine serum. *In Vitro* 15:252-257.
- Gahl WA, Vale AM i Pitot HC (1980). Separation of putrescine oxidase and spermidine oxidase in foetal bovine serum with the aid of a specific radioactive assay of spermidine oxidase. *Biochem J* 187(1):197-204.
- Gahl WA i Pitot HC (1982). Polyamine degradation in foetal and adult bovine serum. *Biochem J* 202(3):603-11.
- Galli F, Beninati S, Benedetti S, Lentini A, Canestrari F, Tabilio A i Buoncristiani U (2001). Polymeric protein-polyamine conjugates: a new class of uremic toxins affecting erythropoiesis. *Kidney Int Suppl* 78:S73-76.
- Garewall HS, Sloan D, Sampliner RE i Fennerty B (1992). Ornithine Decarboxylase Assay in Human Colorectal Mucosa. *Methodological Issues of Importance to Quality Control. Int J Cancer* 52:355-358.
- Gerbaut L (1991). Determination of erythrocytic polyamines by reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem* 37(12):2117-2120.
- Giardiello FM, Hamilton SR, Hyland LM, Yang VW, Tamez P i Casero RA Jr (1997). Ornithine decarboxylase and polyamines in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 57(2):199-201.
- Gilmour SK, Avdalovic N, Madara T i O'Brien TG (1985). Induction of ornithine decarboxylase by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in hamster fibroblasts. Relationship between levels of enzyme activity, immunoreactive protein, and RNA during the induction process. *J Biol Chem* 260(30):16439-16444.
- Gingras, A.-C, Raught, B & Sonenberg, N (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68:913-963.
- Ginty DD, Osborne DL i Seidel ER (1989). Putrescine stimulates DNA synthesis in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 257(1 Pt 1):G145-150.
- Ginty DD, Marlowe M, Pekala PH i Seidel ER (1990). Multiple pathways for the regulation of ornithine decarboxylase in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 258:G454-460.
- Glass JR i Gerner EW (1986). Polyamine-mediated turnover of ornithine decarboxylase in Chinese-hamster ovary cells. *Biochem J* 236(2):351-357.
- Gleeson MH, Cullen J i Dowling RH (1972). Intestinal structure and function after small-bowel bypass in the rat. *Clin Sci* 43:731-742.
- Gosule LC i Schellman JA (1976). Compact form of DNA induced by spermidine. *Nature* 259:333-335.
- Gray NK i Henze M (1994). Regulation of protein synthesis by mRNA structure. *Mol Biol Rep* 19:195-200.
- Grassilli E, Bettuzzi S, Monti D, Ingletti MC, Franceschi C i Corti A (1991). Studies on the relationship between cell proliferation and cell death: opposite patterns of SGP-2 and ornithine decarboxylase mRNA accumulation in PHA-stimulated human lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 180(1):59-63.

Gratzner HG (1982). Monoclonal antibody to 5-bromodeoxyuridine; a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474-475.

Greco S, Huguency I, George P, Perrin P, Louisot P i Biol MC (2000). Influence of spermine on intestinal maturation of the glycoprotein glycosylation process in neonatal rats. *Biochem J* 345:69-75.

Greenberg ME, Greene LA i Ziff EB (1985). Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J Biol Chem* 260(26):14101-14110.

Grens A i Scheffler IE (1990). The 5'- and 3'-untranslated regions of ornithine decarboxylase mRNA affect the translational efficiency. *J Biol Chem* 265 (20):11810-11816.

Grishin NV, Phillips MA i Goldsmith EJ. Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. *Protein Sci* 1995 4(7):1291-1304.

Gritli-Linde A, Nilsson J, Bohlooly-Y M, Heby O i Linde A (2001). Nuclear translocation of antizyme and expression of ornithine decarboxylase and antizyme are developmentally regulated. *Dev Dyn* 220:259-275.

**Ha** HC, Woster PM, Yager JD, Casero RA Jr (1997). The role of polyamine catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(21):11557-11562.

Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM i Casero RA Jr (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(19):11140-11145.

Halmekytö M, Alhonen L, Wahlfors J, Sinervirta R, Eloranta Ti Jänne J (1991a). Characterization of a transgenic mouse line over-expressing the human ornithine decarboxylase gene. *Biochem J* 278(Pt 3): 895-898.

Halmekytö M, Syrjänen K, Jänne J i Alhonen L (1992). Enhanced papilloma formation in response to skin tumor promotion in transgenic mice overexpressing the human ornithine decarboxylase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 187(1):493-497.

Halmekytö M, Alhonen L, Alakuijala L i Jänne J (1993). Transgenic mice over-producing putrescine in their tissues do not convert the diamine into higher polyamines. *Biochem J* 291(Pt 2):505-508.

Harada J i Sugimoto M (1997). Polyamines prevent apoptotic cell death in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res* 753:251-259.

Harari PM, Fuller DJ, Carper SW, Croghan MK, Meyskens FL Jr, Shimm DS i Gerner EW (1990). Polyamine biosynthesis inhibitors combined with systemic hyperthermia in cancer therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19(1):89-96.

Hardt J, Larsson LI i Hougaard DM (2000). Immunocytochemical Evidence Suggesting that Diamine Oxidase Catalyzes Biosynthesis of Gamma-Aminobutyric Acid in Antropeyoric Gastrin Cells. *J Histochem Cytochem* 48:839-846.



Hartmann C i Klinman JP (1991). Estructure-function studies of substrate oxidation by bovine serum amine oxidase: relationship to cofactor structure and mechanism. *Biochemistry* 30(18):4605-4611.

Hasan R, Alam MK i Ali R (1995). Polyamine induced Z-conformation of native calf thymus DNAFEBS Lett 368(1):27-30.

Hauser MR i Cook JS (1990). Uptake and metabolism of putrescine in confluent LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 259(1 Pt 1):C84-91.

Hayashi S i Murakami Y (1995). Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. *Biochem J* 306:1-10.

Hayashi S, Murakami Y i Matsufuji S (1996). Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *Trends Biochem Sci* 21(1):27-30.

He Y, Kashiwagi K, Fukuchi J, Terao K, Shirahata A i Igarashi K (1993). Correlation between the inhibition of cell growth by accumulated polyamines and the decrease of magnesium and ATP. *Eur J Biochem* 217(1):89-96.

Heby O, Marton LJ, Wilson CB i Martinez HM (1975). Polyamines: a high correlation with cell replication. *FEBS Lett* 50(1):1-4.

Hegardt C, Andersson G i Oredsson SM (2000). Changes in polyamine metabolism during glucocorticoid-induced programmed cell death in mouse thymus. *Cell Biol Int* 24(12):871-880.

Heiskala M, Zhang J, Hayashi S, Hölttä E i Andersson LC (1999). Translocation of ornithine decarboxylase to the surface membrane during cell activation and transformation. *Embo J* 18(5):1214-1222.

Heller JS, Fong WF i Canellakis ES (1976). Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1858-1862.

Herbert A i Rich A (1999). Left-handed Z-DNA: structure and function. *Genetica* 106:37-47.

Herr HW, Warrel RP i Burchenal JH (1986). Phase I trial of alpha-difluoromethyl ornithine (DFMO) and methylglyoxal bis(guanylhydrazone) (MGBG) in patients with advanced prostatic cancer. *Urology* 28(6):508-511.

Hibshoosh H, Johnson M i Weinstein IB (1991). Effects of overexpression of ornithine decarboxylase (ODC) on growth control and oncogene-induced cell transformation. *Oncogene* 6(5):739-743.

Hickok NJ, Seppänen PJ, Gunsalus GL i Jänne OA (1987). Complete amino acid sequence of human ornithine decarboxylase deduced from complementary DNA. *DNA* 6(3):179-187.

Hietala O, Dzubow L, Dlugosz AA, Pyle JA, Jenney F, Gilmour SK i O'Brien TG (1988). Activation of human squamous cell carcinoma ornithine decarboxylase activity by guanosine triphosphate. *Cancer Res* 48(5):1252-1257.

High A, Prior T, Bell RA i Rangachari PK (1999). Probing the "active site" of diamine oxidase: structure-activity relations for histamine potentiation by O-alkylhydroxylamines on colonic epithelium. *J Pharmacol Exp Ther* 288(2):490-501.

Hillman RS i Finch CA (1996). Davis FA (ed.). The red cell manual. 7a ed. Philadelphia, USA.

Hixson LJ, Emerson SS, Shassetz LR i Gerner EW (1994). Sources of variability in estimating ornithine decarboxylase activity and polyamine contents in human colorectal mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3(4):317-323.

Hoet PH i Nemery B (2000). Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L417-433.

Hougaard DM, Fujiwara K i Larsson LI (1987). Immunocytochemical localization of polyamines in normal and neoplastic cells. Comparisons to the formaldehyde-fluorescamine and o-phthalaldehyde methods. *Histochem J* 19(12):643-650.

Hougaard DM, Del Castillo AM i Larsson LI (1988). Endogenous polyamines associate with DNA during its condensation in mammalian tissue. A fluorescence cytochemical and immunocytochemical study of polyamines in fetal rat liver. *Eur J Cell Biol* 45(2):311-314.

Hsieh JT, Denning MF, Heidel SM i Verma AK (1990). Expression of human chromosome 2 ornithine decarboxylase gene in ornithine decarboxylase-deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 50(8):2239-2244.

Huber M i Poulin R (1996). Permissive role of polyamines in the cooperative action of estrogens and insulin or insulin-like growth factor I on human breast cancer cell growth. *J Clin Endocrinol Metab* 81(1):113-23.

Hughes CA i Dowling RH (1980). Speed of onset of adaptative mucosal hypoplasia and hypofunction in the intestine of parenterally-fed rats. *Clin Sci* 59:317-327.

Hölttä E i Hovi T (1985). Polyamine depletion results in impairment of polyribosome formation and protein synthesis before onset of DNA synthesis in mitogen-activated human lymphocytes. *Eur J Biochem* 152(1):229-237.

Hölttä E i Pohjanpelto P (1986). Control of ornithine decarboxylase in Chinese hamster ovary cells by polyamines. Translational inhibition of synthesis and acceleration of degradation of the enzyme by putrescine, spermidine, and spermine. *J Biol Chem* 261(20):9502-9508.

Hölttä E, Sistonen L i Alitalo K (1988). The mechanisms of ornithine decarboxylase deregulation in c-Ha-ras oncogene-transformed NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 263(9):4500-4507.

**I**FCC Expert Panel on Theory of Reference Values (1983). The theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 21:749-760.

Igarashi, K i Kashiwagi, K (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 271(3):559-564.

Imanishi Y, Inaba M, Nishizawa Y, Morii H i Otani S (1995). Involvement of polyamines in the proliferation of bovine parathyroid cells. *Miner Electrolyte Metab* 21:197-200.

Isomaa VV, Pajunen AEI, Bardin CW i Jänne OA (1983). Ornithine decarboxylase in mouse kidney. *J Biol Chem* 258:13036-13041.

Ito K, Kashiwagi K, Watanabe S, Kameji T, Hayashi S i Igarashi K (1990). Influence of the 5'-untranslated region of ornithine decarboxylase mRNA and spermidine on ornithine decarboxylase synthesis. *J Biol Chem* 265(22):13036-13041.

**J**ain S, Zon G i Sundaralingam M (1989). Base only binding of spermine in the deep groove of the A-DNA octamer d(GTGTACAC). *Biochemistry* 28:2360-2364.

Janne J, Poso H i Raina A (1978). Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochim Biophys Acta* 473(3-4):241-293.

Jeppesen PB i Mortensen PB (2002). Enhancing bowel adaptation in short bowel syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 4(4):338-347.

Jung MH, Kim SC, Jeon GA, Kim SH, Kim Y, Choi KS, Park SI, Joe MK i Kimm K (2000). Identification of differentially expressed genes in normal and tumor human gastric tissue. *Genomics* 69(3):281-286.

**K**ahana C i Nathans D (1985). Translational regulation of mammalian ornithine decarboxylase by polyamines. *J Biol Chem* 260(29):15390-15393.

Kameji T i Pegg AE (1987). Inhibition of translation of mRNAs for ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase by polyamines. *J Biol Chem* 262(6):2427-2430.

Kanamoto R, Utsunomiya K, Kameji T i Hayashi S (1986). Effects of putrescine on synthesis and degradation of ornithine decarboxylase in primary cultured hepatocytes. *Eur J Biochem* 154(3):539-544.

Kanamoto R, Boyle SM, Oka T i Hayashi S (1987). Molecular mechanisms of the synergistic induction of ornithine decarboxylase by asparagine and glucagon in primary cultured hepatocytes. *J Biol Chem* 262(30):14801-14805.

Kanamoto R, Nishiyama M, Matsufuji S i Hayashi S (1991). Translational control mechanism of ornithine decarboxylase by asparagine and putrescine in primary cultured hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 291(2):247-254.

Kaneko H, Hibasami H, Mori K, Kawarada Y i Nakashima K (1998). Apoptosis induction in human breast cancer MRK-nu-1 cells by a polyamine synthesis inhibitor, methylglyoxal bis(cyclopentylamidino)hydrazine (MGBCP). *Anticancer Res* 18(2A):891-896.

Kashiwagi K, Sakai Y i Igarashi K (1989). Polyamine stimulation of ribosomal synthesis and activity in a polyamine-dependent mutant of *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 268:379-387.

Katz A i Kahana C (1988). Isolation and characterization of the mouse ornithine decarboxylase gene. *J Biol Chem* 263(16):7604-7609.

Kelly D, King TP, Brown DS i McFadyen M (1991). Polyamide profiles of porcine milk and of intestinal tissue of pigs during suckling. *Reprod Nutr Dev* 31(1):73-80.

Kern AD, Oliveira MA, Coffino P i Hackert ML (1999). Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Structure Fold Des* 7(5):567-581.

Kerppola TK (1998). Transcriptional cooperativity: bending over backwards and doing the flip. *Structure* 6:549-554.

Kilpeläinen P, Saarimies J, Kontusaari S, Järvinen M, Soler A, Kallioinen M i Hietala O (2001) Abnormal ornithine decarboxylase activity in transgenic mice increases tumor formation and infertility. *Int J Biochem Cell B* 33:507-520.

Kim SY, Kwon OJ i Park JW (2001). Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye. *Biochimie* 83(5):437-444.

Kohno H, Sasaki K, Yamaguchi M i Ohkubo Y (1997). Spermine modulates calcium flux through the rat erythrocyte membrane. *Biol Pharm Bull* 20(2):153-157.

Koike C, Chao DT, Zetter BR (1999). Sensitivity to polyamine-induced growth arrest correlates with antizyme induction in prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 59:6109-6112.

Kontula KK, Torkkeli TK, Bardin CW i Jänne OA (1984). Androgen induction of ornithine decarboxylase mRNA in mouse kidney as studied by complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(3):731-735.

Koyama T, Fujimoto K, Kang M, Yoshimatsu H, Sakata T, Tsunada S, Morita H, Iwakiri R i Sakai T (1995). Histamine effect on ornithine decarboxylase of rat intestine in cases of ischemia-reperfusion compared with refeeding. *Proc Soc Exp Biol Med* 209(1):27-31.

Koza RA i Herbst EJ (1992). Deficiencies in DNA replication and cell-cycle progression in polyamine-depleted HeLa cells. *Biochem J* 281:87-93.

Kozak M (1989). The scanning model for translation: An update. *J Cell Biol* 108:229-241.

Kramer DL, Fogel-Petrovic M, Diegelman P, Cooley JM, Bernacki RJ, McManis JS, Bergeron RJ i Porter CW (1997). Effects of novel spermine analogues on cell cycle progression and apoptosis in MALME-3M human melanoma cells. *Cancer Res* 57(24):5521-5527.

Kramer DL, Vujcic S, Diegelman P, Alderfer J, Miller JT, Black JD, Bergeron RJ i Porter CW (1999). Polyamine analogue induction of the p53-p21WAF1/CIP1-Rb pathway and G1 arrest in human melanoma cells. *Cancer Res* 59(6):1278-1286.

Kubo S, Tamori A, Nishiguchi S, Omura T, Kinoshita H, Hirohashi K, Kuroki T i Otani S (1998). Relationship of polyamine metabolism to degree of malignancy of human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 5(6):1385-8.

Kumar AP, Mar PK, Zhao B, Montgomery RL, Kang DC i Butler AP (1995). Regulation of rat ornithine decarboxylase promoter activity by binding of transcription factor Sp1. *J Biol Chem* 270(9):4341-4348.

Kumar AP i Butler AP (1997). Transcription factor Sp3 antagonizes activation of the ornithine decarboxylase promoter by Sp1. *Nucleic Acids Res* 25(10):2012-2019.

Kusama-Eguchi, K, Watanabe S, Irisawa, M, Watanabe, K. i Igarashi, K (1991) Correlation between spermine stimulation of rat liver Ile-tRNA formation and structural change of the acceptor stem by spermine. *Biochem Biophys Res Commun* 177(2):745-750.

Kusche J, Menningen R i Izbicki JR (1985). Selmeci, Brosnan i Seiler (eds.). Recent progress in polyamine research. *Akademiai Kiado. Budapest.* Pàg:329-338.

Kusche J i Lorenz W (1987). Diamine oxidase. En: Bergmeyer HU (ed). *Methods in enzymatic analysis, vol 3.* VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany. Pàg:237-250.

Kushner D, Beckman B, Nguyen L, Chen S, Della Santina C, Husserl F, Rice J i Fisher JW (1991). Polyamines in the anemia of end-stage renal disease. *Kidney Int* 39(4):725-732.

**L**aitinen SI, Laitinen PH i Pajunen AE (1984). The effect of testosterone on the half-life of ornithine decarboxylase-mRNA in mouse kidney. *Biochem Int* 9(1):45-50.

LaMuraglia GM, Lacaine F i Malt RA (1986). High ornithine decarboxylase activity and polyamine levels in human colorectal neoplasia. *Ann Surg* 204(1):89-93.

Laitinen J, Stenius K, Eloranta TO i Hölttä E (1998). Polyamines may regulate S-phase progression but not the dynamic changes of chromatin during the cell cycle. *J Cell Biochem* 68(2):200-212.

Landenburg A (1886). Pentamethylendiamin und Tetramethylendiamin. *Ber* 19:780-783.

Law GL, Itoh H, Law DJ, Mize GJ, Merchant JL i Morris DR (1998). Transcription factor ZBP-89 regulates the activity of the ornithine decarboxylase promoter. *J Biol Chem* 273(32):19955-19964.

Law DJ, Du M, Law GL i Merchant JL (1999). ZBP-99 defines a conserved family of transcription factors and regulates ornithine decarboxylase gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 262(1):113-120.

Leuwenhoek A van. (1678) *Observationes D Anthonii Leuwenhoek de natis semine genitali animalculis.* Phil Trans Roy Soc (London) 12:1040-1043.

Leveque J, Bansard JY, Watier E, Catros-Quemener V, Havouis R, Moulinoux JP, Grall JY i Seiler N (1999). Polyamines in human breast cancer and its relations to classical prognostic features: clinical implications. *Anticancer Res* 19(3B):2275-2279.

Lewis JS, Thomas TJ, Shirahata A i Thomas T (2000). Oligodeoxyribonucleotide harboring the estrogen response element in the presence of polyamines: ionic, structural, and DNA sequence specificity effects. *Biomacromolecules* 1:339-349.

Leyden (1872). *Arch. Physiol* 54: 324.

Li L, Rao JN, Bass BL i Wang JY (2001a). NF-kappaB activation and susceptibility to apoptosis after polyamine depletion in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver* 280(5):G992-G1004.

- Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J, Cooper R i Reis DJ (1994a). Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* 263(5149):966-969.
- Li RS, Abrahamsen MS, Johnson RR i Morris DR (1994b). Complex interactions at a GC-rich domain regulate cell type-dependent activity of the ornithine decarboxylase promoter. *J Biol Chem* 269(11):7941-7949.
- Li L, Li J, Rao JN, Li M, Bass BL i Wang JY (1999b). Inhibition of polyamine synthesis induces p53 gene expression but not apoptosis. *Am J Physiol* 276:946-954.
- Li L, Rao JN, Bass BL i Wang JY (2001a). NF-kappaB activation and susceptibility to apoptosis after polyamine depletion in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280(5):G992-G1004.
- Li L, Rao JN, Guo X, Liu L, Santora R, Bass BL i Wang JY (2001b). Polyamine depletion stabilizes p53 resulting in inhibition of normal intestinal epithelial cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C941-953.
- Libby PR (1983). Purification of two spermidine N-acetyltransferases (histone N-acetyltransferases) from calf liver nuclei. *Methods Enzymol* 94:325-328.
- Linden M, Anehus S, Langstrom E, Baldetorp B i Heby O (1985). Cell-cycle phase-dependent induction of ornithine decarboxylase-antizyme. *J Cell Phys* 125:273-276.
- Lindsay GS i Wallace HM (1999). Changes in polyamine catabolism in HL-60 human promyelogenous leukaemic cells in response to etoposide-induced apoptosis. *Biochem J* 337(Pt1):83-87.
- Linsalata M, Russo F, Cavallini A, Berloco P i Di Leo A (1993). Polyamines, diamine oxidase, and ornithine decarboxylase activity in colorectal cancer and in normal surrounding mucosa. *Dis Colon Rectum* 36:662-667.
- Linsalata M, Leo S, Guerra V i Di Leo A (2000). Erythrocyte polyamines and prognosis in colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 20(3B):2113-2117.
- Liu YH i Symons RH (1998). Specific RNA self-cleavage in coconut cadang cadang viroid: potential for a role in rolling circle replication. *RNA* 4(4):418-429.
- Loh TT, Chan RY i Fong WF (1985). Effects of spermine on transferrin and iron uptake by reticulocytes: I. Action on the endocytic uptake of transferrin. *Cell Biol Int Rep* 9(2):143-150.
- Lorenzini EC i Scheffler IE (1997). Co-operation of the 5' and 3' untranslated regions of ornithine decarboxylase mRNA and inhibitory role of its 3' untranslated region in regulating the translational efficiency of hybrid RNA species via cellular factor. *Biochem J* 326(Pt 2):361-367.
- Loser C, Eisel A, Harms D i Folsch UR (1999). Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut* 44:12-16.
- Lovaas E (1997). Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Adv Pharmacol* 38:119-149.

Lozzio CB i Lozzio BB (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45:321-334.

Lu L, Stanley BA i Pegg AE (1991). Identification of residues in ornithine decarboxylase essential for enzymic activity and for rapid protein turnover. *Biochem J* 277(Pt 3):671-675.

Lundgren DW i Hankins J (1978). Metabolism of putrescine to 2-pyrrolidone by rat liver slices. *J Biol Chem* 253(20):7130-7133

Luk GD, Vaughan WP, Burke PJ i Baylin SB (1981). Diamine oxidase as a plasma marker of rat intestinal mucosal injury and regeneration after administration of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 41:2334-2337.

Luk GD i Yang P (1988). Distribution of polyamines and their biosynthetic enzymes in intestinal adaptation. *Am J Physiol* 254(2 Pt 1):G194-200

Lundgren DW i Fales HM (1980). Metabolism of putrescine to 5-hydroxy-2-pyrrolidone via 2-pyrrolidone. *J Biol Chem* 255(10):4481-4486.

Lökvist E, Stjernborg L i Persson L (1993). Feedback regulation of mammalian ornithine decarboxylase. Studies using a transient expression system. *Eur J Biochem* 215(3):753-759.

Lökvist-Wallström E, Stjernborg-Ulvsback L, Scheffler IE i Persson L (1995). Regulation of mammalian ornithine decarboxylase. Studies on the induction of the enzyme by hypotonic stress. *Eur J Biochem* 231(1):40-44.

Lökvist-Wallström E, Takao K, Wendt A, Vargiu C, Yin H i Persson L (2001). Importance of the 3' untranslated region of ornithine decarboxylase mRNA in the translational regulation of the enzyme. *Biochem J* 356(Pt 2), 627-634.

**M**ach M, Kersten H i Kersten W (1981). Measurements of polyamines and their acetylated derivatives in cell extracts and physiological fluids by use of an amino acid analyzer. *J Chromatogr* 223(1):51-57.

Maguire DJ, Voroteliak V, Cowley D i Cannell GR (1992). Human placental oxygen metabolism. *Adv Exp Med Biol* 316:463-466.

Manchester KM, Heston WD i Donner DB (1993). Tumour necrosis factor-induced cytotoxicity is accompanied by intracellular mitogenic signals in ME-180 human cervical carcinoma cells. *Biochem J* 290(Pt 1):185-190.

Manzella JM i Blackshear PJ (1990). Regulation of rat ornithine decarboxylase mRNA translation by its 5'-untranslated region. *J Biol Chem* 265 (20):11817-11822.

Manzella JM, Rychlik W, Rhoads RE, Hershey JW i Blackshear PJ (1991). Insulin induction of ornithine decarboxylase. Importance of mRNA secondary structure and phosphorylation of eucaryotic initiation factors eIF-4B and eIF-4EJ *Biol Chem* 266(4):2383-2389.

Marquet R, Colson P i Houssier C (1986). The condensation of chromatin and histone H1-depleted chromatin by spermine. *J Biol Struct Dyn* 4:205-218.

- Marton LJ i Pegg AE (1995). Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:55-91.
- Marty C, Mori G, Sabini L i Rivarola V (2000). Effects of alpha-difluoromethylornithine on the cyclin A expression in Hep-2 cells. *Biocell* 24(1):49-52.
- Matsubara N, Hietala OA, Gilmour SK, Yum KY, Litwin S, Watts P, Brennan, O'Brien (1995). Association between high levels of ornithine decarboxylase activity and favorable prognosis in human colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1:665-671.
- Matsufuji S, Matsufuji T, Miyazaki Y, Murakami Y, Atkins JF, Gesteland RF, Hayashi S (1995). Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell* 80:51-60
- McCloskey DE, Yang J, Woster PM, Davidson NE i Casero RA, Jr (1996). Polyamine analogue induction of programmed cell death in human lung tumor cells. *Clin Cancer Res* 2(3):441-446.
- McCormack SA i Johnson LR. Role of polyamines in gastrointestinal mucosal growth (1991). *Am J Physiol* 260(6):G795-806.
- McGarrity TJ, Peiffer LP, Bartholomew MJ i Pegg AE (1990). Colonic polyamine content and ornithine decarboxylase activity as markers for adenomas. *Cancer* 66:1539-1543.
- Megosh L, Gilmour SK, Rosson D, Soler AP, Blessing M, Sawicki JA i O'Brien TG (1995). Increased frequency of spontaneous skin tumors in transgenic mice which overexpress ornithine decarboxylase. *Cancer Res* 55 (19):4205-4209.
- Merali S i Clarkson AB Jr (1996). Polyamine analysis using N-hydroxysuccinimidyl-6-aminoquinoyl carbamate for pre-column derivatization. *J Chromatogr B Biomed Appl.* Jan 26;675(2):321-326.
- Meyskens FL Jr, Gerner EW, Emerson S, Pelot D, Durbin T, Doyle K i Lagerberg W (1998). Effect of alpha-difluoromethylornithine on rectal mucosal levels of polyamines in a randomized, double-blinded trial for colon cancer prevention. *J Natl Cancer Inst* 90(16):1212-1218.
- Mishra M, Chandra S, Pandey VC i Tekwani BL (1997). Polyamine metabolism in various tissues during pathogenesis of chloroquine-susceptible and resistant malaria. *Cell Biochem Funct* 15(4):229-35.
- Mitchell JL, Diveley RR Jr i Bareyal-Leyser A (1992). Abnormal accumulation and toxicity of polyamines in a difluoromethylornithine-resistant HTC cell variant. *Biochim Biophys Acta* 1136(2):136-142.
- Mitchell MF, Tortolero-Luna G, Lee JJ, Hittelman WN, Lotan R, Wharton JT, Hong WK i Nishioka K (1998). Phase I dose de-escalation trial of alpha-difluoromethylornithine in patients with grade 3 cervical intraepithelial neoplasia. *Surgery* 123(2):205-211.
- Moffatt J, Hashimoto M, Kojima A, Kennedy DO, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H i Matsui-Yuasa I (2000). Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with modulation of polyamine metabolism and caspase-3 activation. *Carcinogenesis* 21(12):2151-2157.



- Momany C, Ernst S, Ghosh R, Chang NL i Hackert ML (1995). Orystallographic structure of a PLP-dependent ornithine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a to 3.0 A resolution. *J Mol Biol* 252(5):643-655.
- Monti MG, Ghiaroni S, Pernecco L, Barbieri D, Marverti G i Franceschi C (1998). Polyamine depletion protects HL-60 cells from 2-deoxy-D-ribose-induced apoptosis. *Life Sci* 62(9):799-806.
- Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Cuellar A, Corona N (1995). Modulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase and oxidative phosphorylation by Ca<sup>2+</sup> in pancreas and adrenal cortex mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 319(2):432-444.
- Morris DR i Pardee AB (1965). A biosynthetic ornithine decarboxylase in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 20(6):697-702.
- Mosbascher A, Finley D, Schmidt M, Mathur R i Zetter B (2000). Cell cycle Control by Antizyme Mediated Ubiquitin Independent Cyclin Degradation [Abstract]. *Mol Biol Cell* 11(Suppl):290A.
- Moshier JA, Dosesescu J, Skunca M i Luk GD (1993). Transformation of NIH/3T3 cells by ornithine decarboxylase overexpression. *Cancer Res* 53(11):2618-2622.
- Moshier JA, Skunca M, Wu W, Boppana SM, Rauscher FJ 3rd i Dosesescu J (1996). Regulation of ornithine decarboxylase gene expression by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Nucleic Acids Res* 24(6):1149-1157.
- Moulinoux JP, Le Pogamp P, Quemener V, Le Calve M, Joyeux V i Chevet D (1981). Red cell free polyamine concentrations in patients on maintenance hemodialysis. *Life Sci* 29(9):955-962.
- Moulinoux JP, Le Calve M, Quemener V i Quash G (1984). In vitro studies on the entry of polyamines into normal red blood cells. *Biochimie* 66(5):385-393.
- Moulinoux JP, Quemener V, Larzul JJ, Le Calve M, Roch AM, Toujas L, Quash G (1984). Red blood cell polyamines in mice bearing the Lewis lung carcinoma (3LL) and in patients with bronchopulmonary cancer. *Int J Cancer* 34:277-281.
- Moulinoux JP, Delamaire D, Beau B, Quemener V, Brissot P, Le Calve M, Deugnier Y, Chambon Y i Bourel M (1985). Diagnostic value of erythrocyte-free polyamines and histaminemia in malignant hepatic tumors and in liver cirrhosis. *Clin Chim Acta* 145:77-87.
- Moulinoux JP, Quemener V i Chambon Y (1987). Evolution of red blood cell polyamine levels in partially hepatectomized rat. *Eur J Cancer* 23:237-244.
- Moulinoux JP, Quemener V, Khan NA, Havouis R i Martin C (1989). Spermidine uptake by erythrocytes from normal and Lewis lung carcinoma (3LL) grafted mice: II. In vivo study. *Anticancer Res* 9(4):1063-1067.
- Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K i Ichihara A (1992a). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 360(6404):597-599.
- Murakami Y, Ichiba T, Matsufuji S i Hayashi S (1996). Cloning of antizyme inhibitor, a highly homologous protein to ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 271(7):3340-3342.

Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi SI, Tanahashi N i Tanaka K (1999). ATP-Dependent inactivation and sequestration of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome are prerequisites for degradation. *Mol Cell Biol* 19(10):7216-7227.

Myojo S, Tsujikawa T, Sasaki M, Fujiyama Y i Bamba T (1997). Trophic effects of glicentin on rat small-intestinal mucosa in vivo and in vitro. *J Gastroenterol* 32:300-305.

**N**agoshi S i Fujiwara K (1994). Putrescine as a comitogen of epidermal growth factor in rat liver growth. *Hepatology* 20(3):725-730.

Narvaiza I, Mazzolini G, Barajas M, Duarte M, Zaratiegui M, Qian C, Melero I, Prieto J. (2000). Intratumoral Coinjection of Two Adenoviruses, One encoding the Chemokine IFN-gamma-Inducible Protein-10 and Another Encoding IL-12, Results in Marked Antitumoral Synergy. *J Immunol* 164:3112-3122.

Natta CL i Kremzner LT (1982). Polyamines and membrane proteins in sickle cell disease. *Blood Cells* 8(2):273-280.

Nemoto T, Kamei S, Seyama Y i Kubota S (2001). p53 independent G(1) arrest induced by DL-alpha-difluoromethylornithine. *Biochem Biophys Res Commun* 280(3):848-854.

Nightingale J (1999a). Short bowel, short answer?. *Gut* 45(4):478-479.

Nightingale JMD (1999b). Management of patients with a short bowel. *Nutrition* 15, 633-637.

Nilsson J, Koskiniemi S, Persson K, Grahn B i Holm I (1997). Polyamines regulate both transcription and translation of the gene encoding ornithine decarboxylase antizyme in mouse. *Eur J Biochem* 250(2):223-231.

Nilsson J, Grahn B i Heby O (2000). Antizyme inhibitor is rapidly induced in growth-stimulated mouse fibroblasts and releases ornithine decarboxylase from antizyme suppression. *Biochem J* 346:699-704.

Nitta T Igarashi K, Yamashita A, Yamamoto M i Yamamoto N (2001). Involvement of polyamines in B cell receptor-mediated apoptosis: spermine functions as a negative modulator. *Exp Cell Res* 265(1):174-183.

**O**'Brien TG, Simsiman RC i Boutwell RK (1975a). Induction of the polyamine-biosynthetic enzymes in mouse epidermis by tumor-promoting agents. *Cancer Res* 35:1662-1670.

O'Brien TG, Simsiman RC i Boutwell RK (1975b). Induction of the polyamine-biosynthetic enzymes in mouse epidermis and their specificity for tumor promotion. *Cancer Res* 35: 2426-2433.

O'Brien TG, Madara T, Pyle JA i Holmes M (1986). Ornithine decarboxylase from mouse epidermis and epidermal papillomas: differences in enzymatic properties and structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(24):9448-9452.

O'Brien TG, Hietala O, O'Donnell K i Holmes M (1987). Activation of mouse epidermal tumor ornithine decarboxylase by GTP: evidence for different catalytic forms of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24):8927-8931.

O'Brien TG, Megosh LC, Gilliard G i Soler AP (1997). Ornithine decarboxylase overexpression is a sufficient condition for tumor promotion in mouse skin. *Cancer Res* 57(13):2630-2637.

Obenrader MF i Prouty WF (1977). Detection of multiple forms of rat liver ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 252:2860-2865.

Okuyama T i Kobayashi Y (1961). Determination of diamine oxidase activity by liquid scintillation counting. *Arch Biophys* 95(3):242-244.

Olaya J, Neopikhanov V i Uribe A (1999). Lipopolysaccharide of *Escherichia coli*, polyamines, and acetic acid stimulate cell proliferation in intestinal epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35:43-48.

Olive JE i Collins RA (1998). Spermine switches a *Neurospora* VS ribozyme from slow Cis cleavage to fast trans cleavage. *Biochemistry* 37(18):6476-84.

Orta X, Balsells J, Olsina J, Venereo Y, Segovia-Silvestre T, Farriol M (2002). Quantitative analysis of ornithine decarboxylase mRNA by Reverse Transcription-PCR with the LightCycler system. *Clinical Chemistry* 48:1779-1781.

Osborne DL i Seidel ER (1990). Gastrointestinal luminal polyamines: cellular accumulation and enterohepatic circulation. *Am J Physiol* 258(4 Pt 1):G576-584.

Osterman A, Grishin NV, Kinch LN i Phillips MA (1994). Formation of functional cross-species heterodimers of ornithine decarboxylase. *Biochemistry* 33(46):13662-13667.

Osterman AL, Kinch LN, Grishin NV i Phillips MA (1995a). Acidic residues important for substrate binding and cofactor reactivity in eukaryotic ornithine decarboxylase identified by alanine scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 270 (20):11797-11802.

Osterman AL, Lueder DV, Quick M, Myers D, Canagarajah BJ i Phillips MA (1995b). Domain organization and a protease-sensitive loop in eukaryotic ornithine decarboxylase. *Biochemistry* 34(41):13431-13436.

Osterman, AL, Brooks, HB, Jackson, L, Abbott, JJ & Phillips, MA (1999). Lysine-69 plays a key role in catalysis by ornithine decarboxylase through acceleration of the Schiff base formation, decarboxylation, and product release steps. *Biochemistry* 38(36):11814-11826.

Osterman AL, Brooks HB, Rizo J i Phillips MA (1997). Role of Arg-277 in the binding of pyridoxal 5'-phosphate to *Trypanosoma brucei* ornithine decarboxylase. *Biochemistry* 36(15):4558-4567.

Ota DM, Nishioka K, Grossie B, Dixon D (1986). Erythrocyte polyamine levels during intravenous feeding of patients with colorectal carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22(7):837-842.

Otieno MA i Kensler TW (2000). A role for protein kinase C-delta in the regulation of ornithine decarboxylase expression by oxidative stress. *Cancer Res* 60(16):4391-4396.

**P**aasinen-Sohns A i Hölttä E (1997). Cells transformed by ODC, c-Ha-ras and v-src exhibit MAP kinase/Erk-independent constitutive phosphorylation of Sos, Raf

and c-Jun activation domain, and reduced PDGF receptor expression. *Oncogene* 15(16):1953-1966.

Packham G i Cleveland JL (1994). Ornithine decarboxylase is a mediator of c-Myc-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 14(9):5741-5747.

Palvimo JJ, Eisenberg LM i Jänne OA (1991). Protein-DNA interactions in the cAMP responsive promoter region of the murine ornithine decarboxylase gene. *Nucleic Acids Res* 19(14):3921-3927.

Palvimo JJ, Partanen M i Jänne OA (1996). Characterization of cell-specific modulatory element in the murine ornithine decarboxylase promoter. *Biochem J* 316(Pt 3):993-998.

Panagiotidis CA, Artandi S, Calame K i Silverstein SJ (1995). Polyamines alter sequence-specific DNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 23(10):1800-1809.

Parchment RE i Pierce GB (1989). Polyamine oxidation, programmed cell death, and regulation of melanoma in the murine embryonic limb. *Cancer Res* 49(23):6680-6686.

Paridaens R, Uges DR, Barbet N, Choi L, Seeghers M, van der Graaf WT, GroenHJ, Dumez H, Buuren IV, Muskiet F, Capdeville R, Oosterom AT i de Vries EG (2000). A phase I study of a new polyamine biosynthesis inhibitor, SAM486A, in cancer patients with solid tumours. *Br J Cancer* 83(5):594-601.

Paulsen JE, Reistad R, Eliassen KA, Sjaastad OV, Alexander J (1997). Dietary polyamines promote the growth of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Carcinogenesis* 18(10):1871-1875.

Pavlova BG, Muhlberger HH, Strobl H, Grill R, Haslberger A, Varga F, Auer H, Heinz R, Salamon J, Stacher A (1995). B lymphocytes with latent EBV infection appearing in long-term bone marrow cultures (HLTBMCs) from haematological patients induce lysis of stromal microenvironment. *Br J Haematol* 89:704-711.

Pearson WR i Lipman DJ (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(8):2444-2448.

Pegg AE i Williams-Ashman HG (1968). Biosynthesis of putrescine in the prostate gland of the rat. *Biochem J* 108(4):533-539.

Pegg AE i McGill S (1979). Decarboxylation of ornithine and lysine in rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 568(2):416-427.

Pegg AE i McCann PP (1982). Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 243(5):C212-221.

Pegg AE i Erwin BG (1985). Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in rat tissues by polyamines. *Biochem J* 231(2):285-289.

Pegg AE (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* 234(2):249-262.

Pegg AE (1988). Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res* 48(4):759-774.

Pelta, J, Livolant F i Sikorav J-L (1995). DNA aggregation induced by polyamines and cobalthexamine. *J Biol Chem* 271:5656-5662.

Penning LC, Schipper RG, Vercammen D, Verhofstad AA, Denecker T, Beyaert R i Vandenameele P (1998). Sensitization of tnf-induced apoptosis with polyamine synthesis inhibitors in different human and murine tumour cell lines. *Cytokine* 10(6):423-431.

Perros P i Weightman DR (1991). Measurement of cell proliferation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a monoclonal antibody to bromodeoxyuridine. *Cell Prolif* 24:517-523.

Persson L, Holm I i Heby O (1986). Translational regulation of ornithine decarboxylase by polyamines. *FEBS Lett* 205:175-178.

Persson L, Holm I i Heby O (1988). Regulation of ornithine decarboxylase mRNA translation by polyamines. Studies using a cell-free system and a cell line with an amplified ornithine decarboxylase gene. *J Biol Chem* 263(7):3528-3533.

Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI i Hellen CUT (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7029-7036.

Pfeffer LM, Yang CH, Murti A, McCormack SA, Viar MJ, Ray RM i Johnson LR (2001). Polyamine depletion induces rapid NF- $\kappa$ B activation in IEC-6 cells. *J Biol Chem* 276(49):45909-45913.

Peulen O, Pirlet C, Klimek M, Goffinet G i Dandrifosse G (1998). Comparison between the natural postnatal maturation and the spermine-induced maturation of the rat intestine. *Arch Physiol Biochem* 106(1):46-55.

Pfeffer LM, Yang CH, Pfeffer SR, Murti A, McCormack SA i Johnson, LR (2000). Inhibition of ornithine decarboxylase induces STAT3 tyrosine phosphorylation and DNA binding in IEC-6 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(2):C331-335.

Pignata S, Di Luccia A, Lamanda R, Menchise A i D'Agostino L (1999). Interaction of putrescine with nuclear oligopeptides in the enterocyte-like Caco-2 cells. *Digestion* 60:255-261.

Piacentini M, Sartori C, Beninati S, Bargagli AM i Ceru-Argento MP (1986). Ornithine decarboxylase, transglutaminase, diamine oxidase and total diamines and polyamines in maternal liver and kidney throughout rat pregnancy. *Biochem J* 234(2):435-440.

Piacentini M, Fesus L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L i Melino G (1991). The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis). *Eur J Cell Biol* 54(2):246-254.

Piacenza L, Peluffo G i Radi R (2001). L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7301-7306.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou M, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmami P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 47:323-330.

Pohjanpelto P i Hölttä E (1996). Phosphorylation of Okazaki-like DNA fragments in mammalian cells and role of polyamines in the processing of this DNA. *Embo J* 15(5):1193-1200.

Pomidor, MM, Cimildoro, R, Lazatin, B, Zheng, P, Gurr, JA, Leigh, IM, Jänne, OA, Tuan, RS i Hickok, NJ (1999). Phosphorylated human keratinocyte ornithine decarboxylase is preferentially associated with insoluble cellular proteins. *Mol Biol Cell* 10(12):4299-4310.

Porciani S, Lanini A, Balzi M, Faraoni P i Becciolini A (2001). Polyamines as biochemical indicators of radiation injury. *Phys Med* 17:187-188.

Porter CW, Herrera-Ornelas, Pera P, Petrelli NF i Mittleman A (1987). Polyamine biosynthetic activity in normal and neoplastic human colorectal tissues. *Cancer* 60:1275-1281.

Poulin R i Pegg AE (1990). Regulation of ornithine decarboxylase expression by anisotonic shock in alpha-difluoromethylornithine-resistant L1210 cells. *J Biol Chem* 265(7):4025-4032.

Poulin R, Lu L, Ackermann B, Bey P i Pegg AE (1992). Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *J Biol Chem* 267(1):150-158.

Poulin R, Coward JK, Lakanen JR i Pegg AE (1993). Enhancement of the spermidine uptake system and lethal effects of spermidine overaccumulation in ornithine decarboxylase-overproducing L1210 cells under hyposmotic stress. *J Biol Chem* 268(7):4690-4698.

Poulin R, Pelletier G i Pegg AE (1995b). Induction of apoptosis by excessive polyamine accumulation in ornithine decarboxylase-overproducing L1210 cells. *Biochem J* 311(Pt 3):723-727.

Prados MD, Wara WM, Sneed PK, McDermott M, Chang SM, Rabbitt J, Page M, Malec M, Davis RL, Gutin PH, Lamborn K, Wilson CB, Phillips TL i Larson DA (2001). Phase III trial of accelerated hyperfractionation with or without difluoromethylornithine (DFMO) versus standard fractionated radiotherapy with or without DFMO for newly diagnosed patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49(1):71-77.

Pyronnet S, Pradayrol L i Sonenberg N (2000). A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5(4):607-616.

**Q**uash GA i Wilson MB (1967). Polyamines in human serum. *West Indian Med J* 16(2):81-91.

**R**adford DM, Nakai H, Eddy RL, Haley LL, Byers MG, Henry WM, Lawrence DD, Porter CW i Shows TB. Two chromosomal locations for human ornithine decarboxylase gene sequences and elevated expression in colorectal neoplasia. *Cancer Res.* 1990 Oct 1;50(19):6146-6153.

Radtke W, Scheuermann E, Desser H (1984). Polyamine induced suppression of erythropoiesis in uremia. *Haematologia (Budap)* 17(2):151-160.

- Ray RM, Zimmerman BJ, McCormack SA, Patel TB i Johnson LR (1999). Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21(Waf1/Cip1), p27(Kip1), and p53 in IEC-6 cells. *Am J Physiol* 276(3 Pt 1):C684-691.
- Ray RM, Viar MJ, Yuan Q i Johnson LR (2000). Polyamine depletion delays apoptosis of rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(3):C480-489.
- Ray RM, McCormack SA, Johnson LR (2001). Polyamine depletion arrests growth of IEC-6 and Caco-2 cells by different mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(1):G37-43.
- Rao JN, Li J, Li L, Bass BL i Wang JY (1999). Differentiated intestinal epithelial cells exhibit increased migration through polyamines and myosin II. *Am J Physiol* 277(6 Pt 1):G1149-1158.
- Ravanko K, Järvinen K, Paasinen-Sohns A i Hölttä E (2000). Loss of p27 Kip1 from Cyclin E/Cyclin-dependent Kinase (CDK) 2 but not from Cyclin D1/CDK4 Complexes in Cells Transformed by Polyamine Biosynthetic Enzymes. *Cancer Res* 60:5244-5253.
- Reddy SG, McLlheran SM, Cochran BJ, Worth LL, Bishop LA, Brown PJ, Knutson VP I Haddox MK (1996). Multisite phosphorylation of ornithine decarboxylase in transformed macrophages results in increased intracellular enzyme stability and catalytic efficiency. *J Biol Chem* 271(40), 24945-24953.
- Reed AH, Henry RJ i Mason WB (1971). Influence of the statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem* 17:275-284.
- Ripoll JP, Roch AM, Quash GA i Grange J (1980). An automatic continuous flow method for the determination of antipolyamine antibodies in human sera. *J Immunol Methods* 33(2):159-173.
- Roch AM, Quash GA, Ripoll JP i Saez S (1979). Evidence for natural antibodies (IgG) to polyamines in human sera. *Recent Results Cancer Res* 67:56-62.
- Roch AM, Quash G i Huppert J (1980). Immunochemical evidence for the specific binding of putrescine to plasma proteins including fibronectin. *C R Seances Acad Sci D* 290(6):449-452.
- Roch AM, Thomas V, Quash G, Moulinoux JP, Delcros JG (1984). A quantitative and qualitative study of the transglutaminase-mediated insertion of polyamines into plasma proteins from patients with bronchopulmonary cancer. *Int J Cancer* 33(6):787-793.
- Rokkas T, Vaja S, Taylor P, Murphy GM, Dowling RH (1990a). Effect of intestinal diamine oxidase (DAO) depletion by heparin on mucosal polyamine metabolism. *Digestion* 46:378-382.
- Rokkas T, Vaja S, Murphy GM i Dowling RH (1990b). Aminoguanidine blocks intestinal diamine oxidase (DAO) activity and enhances the intestinal adaptive response to resection in the rat. *Digestion* 46(Suppl 2):447-457.
- Rosenblum MG i Russell DH (1977). Conjugation of radiolabeled polyamines in the rat. *Cancer Res* 37(1):47-51.
- Roch AM, Delcros JG, Ripoll JP, Thomas V, Richard J, Quash G (1990). A novel covalent enzyme-linked immunoassay (CELIA) for simultaneously measuring free and

immune complex bound antibodies of defined specificity. I. Application to naturally occurring antipolyamine antibodies in human sera. *J Immunol Methods* 133(1):1-11.

Rodriguez-Sallaberry C, Simmen FA i Simmen RC (2001). Polyamine- and insulin-like growth factor-I-mediated proliferation of porcine uterine endometrial cells: a potential role for spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase during peri-implantation. *Biol Reprod* 65:587-594.

Rosenberg-Hasson Y, Strumpf D i Kahana C (1991). Mouse ornithine decarboxylase is phosphorylated by casein kinase-II at a predominant single location (serine 303). *Eur J Biochem* 197(2):419-424.

Rouzina I i Bloomfield VA (1998). DNA bending by small, mobile multivalent cations. *Biophys J* 74:3152-3164.

Russell D i Snyder SH (1968). Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 60(4):1420-1427.

**S**aeeki Y, Uehara N, Shirakawa S (1978). Sensitive fluorimetric method for the determination of putrescine, spermidine and spermine by high-performance liquid chromatography and its application to human blood. *J Chromatogr* 145(2):221-229.

Sambrook J, Fritsch EF i Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Nolan C (ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA. Pàg: 18.15.

Sandler RS, Ulshen MH, Lyles CM, McAuliffe CA, Fuller CR (1992). Rectal mucosal ornithine decarboxylase activity is not a useful marker of risk for colorectal neoplasia. *Dig Dis Sci* 37(11):1718-1724.

Sarhan S, Knodgen B i Seiler N (1989). The gastrointestinal Tract as a Polyamine Source for Tumor Growth. *Anticancer Res* 9:215-224.

Sarhan S, Quemener V, Moulinoux JP, Knodgen B, Seiler N (1991). On the degradation and elimination of spermine by the vertebrate organism. *Int J Biochem* 23(5-6):617-626.

Satoh N, Hibasami H, Mori K, Kaneko H, Wakabayashi H, Hirata K, Sonoda J, Nakashima K i Uchida A (1999). Growth inhibition of human osteosarcoma Hu09 cells by methylglyoxal bis(cyclopentylamidino)hydrazone) in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 6(3):627-630.

Satriano J, Matsufuji S, Murakami Y, Lortie MJ, Schwartz D, Kelly CJ, Hayashi S i Blantz RC (1998). Agmatine suppresses proliferation by frameshift induction of antizyme and attenuation of cellular polyamine levels. *J Biol Chem* 273(25):15313-15316.

Sauve DM, Anderson HJ, Ray JM, James WM i Roberge M (1999). Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH 2-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J Cell Biol* 145:225-235.

Scalabrino G i Ferioli ME (1982). Polyamines in mammalian tumors. Part II. *Adv Cancer Res* 36:1-102.



Schipper RG, Penning LC i Verhofstad AA (2000). Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors?. *Semin Cancer Biol* 10(1):55-68.

Schreiner P (1878). Über eine neue organische Basis in thierischen Organismen. *Leibigs Ann* 194:68-84.

Schuber F (1989). Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem J* 260: 1-10.

Seely JE, Pösö H i Pegg AE (1982a). Effects of androgens on turnover of ornithine decarboxylase in mouse kidney. *J Biol Chem* 257:7549-7553.

Seely JE, Pösö H i Pegg AE (1982b). Purification of ornithine decarboxylase from kidneys of androgen-treated mice. *Biochemistry* 21:3394-3399.

Seghieri G, Gironi A, Mammini P, Alviggi L, De Giorgio LA, Bartolomei G, Ignesti G i Franconi F (1992). Erythrocyte spermidine levels in IDDM patients. *Diabetes Care* 15:543-545.

Seghieri G, Anichini R, Ciuti M, Gironi A, Bennardini F i Franconi F (1997). Raised erythrocyte polyamine levels in non-insulin-dependent diabetes mellitus with great vessel disease and albuminuria. *Diabetes Res Clin Pract*;37:15-20.

Segovia-Silvestre T, Pita AM, Vilar L, Venereo Y, Orta X, Farriol M (2001). Intestinal ornithine decarboxylase in short bowel syndrome patients with oral diet. *Clin Nutr* 20:171-175.

Seidel ER i Ginty DD (1990). Apparent post-transcriptional modification of ornithine decarboxylase accounts for its induction in IEC-6 cells in culture. *Digestion* 46:383-389.

Seiler N i Al-Therib MJ (1974). Putrescine catabolism in mammalian brain. *Biochem J* 144(1):29-35.

Seiler N i Eichertopf B (1975). 4-aminobutyrate in mammalian putrescine catabolism. *Biochem J* 152(2):201-210.

Seiler N (1980). On the role of GABA in vertebrate polyamine metabolism. *Physiol Chem Phys* 12(5):411-429. Shaff RE i Beaven MA (1976). Turnover and synthesis of diamine oxidase (DAO) in rat tissues. Studies with heparin and cycloheximide. *Biochem Pharmacol* 25:1057-1062.

Seiler N, Bolkenius FN, Knodgen B (1985). The influence of catabolic reactions on polyamine excretion. *Biochem J* 225(1):219-226.

Seiler N (1987). Functions of polyamine acetylation. *Can J Physiol Pharmacol* 65:2024-2035.

Seiler N (1990). Polyamine metabolism. *Digestion* 46(Suppl 2):319-330.

Sen D i Crothers DM (1986). Condensation of chromatin: role of multivalent cations. *Biochemistry* 25:1495-1503.

Serra L, Ribas L, García-Closas R (1996). Avaluació de l'estat nutricional de la població catalana. Llibre blanc. Barcelona. Departament de Sanitat i Seguretat Social.

- Shah N, Thomas TJ, Lewis JS, Klinge CM, Shirahata A, Gelinas C i Thomas T (2001). Regulation of estrogenic and nuclear factor kappa B functions by polyamines and their role in polyamine analog-induced apoptosis of breast cancer cells. *Oncogene* 20(14):1715-1729.
- Shantz LM i Pegg AE (1994). Overproduction of ornithine decarboxylase caused by relief of translational repression is associated with neoplastic transformation. *Cancer Res* 54(9):2313-2316.
- Shantz LM, Hu RH i Pegg AE (1996). Regulation of ornithine decarboxylase in a transformed cell line that overexpresses translation initiation factor eIF-4E. *Cancer Res* 56(14):3265-3269.
- Shantz LM i Pegg AE (1999). Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 31(1):107-122.
- Shigesawa A, Onoda N, Chung YS, Yano Y, Otani S, Fukushima S i Sowa M (1998). Elevation in putrescine level and spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity coincide with tumor development in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon. *Oncol Rep* 5(1):125-129.
- Siimes M i Jänne J (1967). *Acta Chem Scand* 21:815-817.
- Sistonen L, Hölttä E, Lehväslaiho H, Lehtola L i Alitalo K (1989a). Activation of the neu tyrosine kinase induces the fos/jun transcription factor complex, the glucose transporter and ornithine decarboxylase. *J Cell Biol* 109(5):1911-1919.
- Sistonen L, Hölttä E, Mäkela TP, Keski-Oja J i Alitalo K (1989b). The cellular response to induction of the p21 c-Ha-ras oncoprotein includes stimulation of jun gene expression. *Embo J* 8(3):815-822.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK i Gartner FH (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- Snyder RD (1989). Polyamine depletion is associated with altered chromatin structure in HeLa cells. *Biochem J* 260(3):697-704.
- Stabellini G, Bosi GP, Valeno V, Pellati A, Masotti M, Fiocchi O, Calastrini C i Ricci G (1998). Relation between the osmolality trend and ornithine decarboxylase activity in red blood cells of uremic patients during hemodialytic treatment. *Biomed Pharmacother* 52:166-168.
- Stefanelli C, Pignatti C, Tantini B, Fattori M, Stanic I, Mackintosh CA, Flamigni F, Guarnieri C, Caldarella CM i Pegg AE (2001). Effect of polyamine depletion on caspase activation: a study with spermine synthase-deficient cells. *Biochem J* 355(Pt 1):199-206.
- Stocks J, Dormandy TL (1971). The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 20(1):95-111.
- Sulpice JC, Moreau C, Devaux PF, Zachowski A i Giraud F (1996). Antagonist effects of Ca<sup>2+</sup> and spermine on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-mediated transmembrane redistribution of phospholipids in large unilamellar vesicles and in erythrocytes. *Biochemistry* 35(41):13345-13352.
- Sugahara K, Nakamura M, Nagisa J, Masuda M, Nunokawa Y, Fujii N i Yamashina I (1989). Regulation of serum glycosaminoglycan sulfotransferase activities:

inhibition by sulfated glycosaminoglycans and activation by polyamines and basic peptides including a polylysine-containing segment of the c-Ki-ras 2 protein. *J Biochem (Tokyo)* 106(5):910-919.

Suzuki T, He Y, Kashigawa K, Murakami Y, Hayashi S i Igarashi K (1994). Antizyme protects against abnormal accumulation and toxicity of polyamines in ornithine decarboxylase-overproducing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8930-8934.

Sward K, Nilsson BO i Hellstrand P (1997). Inhibition of polyamine synthesis influences contractility of intestinal smooth muscle in culture. *Am J Physiol* 273(1 Pt 1):C77-84.

Symons MC (1995). Polyamines to target drugs to DNA. *Free Radic Res* 22(1):1-9.

**T**abor H i Tabor CW (1966). Preliminary studies on the enzymatic metabolism of spermidine by *Escherichia coli* extracts. *Fed Proc* 25(3):879-880.

Tabor H i Tabor CW (1983) Polyamines (Methods in enzymology 94). Acad Press Inc, New York, USA.

Tabor CW i Tabor H (1984). Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53:749-790.

Tadolini B, Hakim G, Orlandini G, Casti A (1986). Intracellular location of polyamines associated to red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 134(3):1365-71.

Tadolini B (1988). Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Biochem J* 249:33-36.

Takemoto T, Nagamatsu Y i Oka T (1983). The study of spermidine-stimulated polypeptide synthesis in cell-free translation of mRNA from lactating mouse mammary gland. *Biochem Biophys Acta* 740:73-79.

Talpaz M, Plager C, Quesada J, Benjamin R, Kantarjian H i Gutterman J (1986). Difluoromethylornithine and leukocyte interferon: a phase I study in cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22(6):685-689.

Tamura H, Horiike K, Fukuda H i Watanabe T (1989). Kinetic studies on the inhibition mechanism of diamine oxidase from porcine kidney by aminoguanidine. *J Biochem (Tokyo)* 105(2):299-306.

Tantini B, Flamigni F, Pignatti C, Stefanelli C, Fattori M, Facchini A, Giordano E, Clo C i Caldarera CM (2001). Polyamines, NO and cGMP mediate stimulation of DNA synthesis by tumor necrosis factor and lipopolysaccharide in chick embryo cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 49:408-416.

Taylor RG, Beveridge DJ i Fuller PJ (1992). Expression of ileal glucagon and peptide tyrosine-tyrosine genes. Response to inhibition of polyamine synthesis in the presence of massive small-bowel resection. *Biochem J* 286:737-741.

ter Steege JC, Buurman WA i Forget PP (1997). Spermine induces maturation of the immature intestinal immune system in neonatal mice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 25(3):332-340.

ter Steege JC, Forget PP i Buurman WA (1999). Oral spermine administration inhibits nitric oxide-mediated intestinal damage and levels of systemic inflammatory mediators in a mouse endotoxin model. *Shock* 11(2):115-119.

Terpstra OT, van Blanckestein M, Dees J i Eilers GA (1987). Abnormal pattern of cell proliferation in the entire colonic mucosa of patients with colon adenomas or cancer. *Gastroenterology* 92:704-708.

Thomas TJ i Bloomfield VA (1984). Ionic and structural effects on the thermal helix-coil transition of DNA complexed with natural and synthetic polyamines. *Biopolymers* 23:1295-1306.

Thomas TJ, Gunnia UB i Thomas T (1991). Polyamine-induced B-DNA to Z-DNA conformational transition of a plasmid DNA with (dG-dC)<sub>n</sub> insert. *J Biol Chem* 266(10):6137-6141.

Thomas T i Thomas TJ (1993). Structural specificity of polyamines in modulating the binding of estrogen receptor to potential Z-DNA forming sequences. *J Recept Res* 13(8):1115-1133.

Thomas T i Thomas TJ (1994). Regulation of cyclin B1 by estradiol and polyamines in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 54(4):1077-1084.

Thomas T, Kulkarni GD, Gallo MA, Greenfield N, Lewis JS, Shirahata A i Thomas TJ (1997a). Effects of natural and synthetic polyamines on the conformation of an oligodeoxyribonucleotide with the estrogen response element. *Nucleic Acids Res* 25(12):2396-2402.

Thomas T i Thomas TJ (2001). Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 58(2): 244-258.

Thomas TJ, Shah N, Faaland CA, Gallo MA, Yurkow E i Satyaswaroop PG (1997b). Anti-tumor effects of a bis(benzyl)spermine analog on MCF-7 breast cancer cells in culture and in nude mice xenografts. *Oncol Rep* 4:5-13.

Thyberg J i Fredholm BB (1987). Induction of ornithine decarboxylase activity and putrescine synthesis in arterial smooth muscle cells stimulated with platelet-derived growth factor. *Exp Cell Res* 170(1):160-169.

Tippin DB i Sundaralingam M (1997). Nine polymorphic crystal structures of d(CCGGGCCCCGG), d(CCGGGCCm 5 CGG), d(Cm 5 CGGGCCm 5 CGG) and d(CCGGGCC(Br)5 CGG) in three different conformations: effects of spermine binding and methylation on the bending and condensation of A-DNA. *J Mol Biol* 267:1171-1185.

Tobias KE i Kahana C (1993). Intersubunit location of the active site of mammalian ornithine decarboxylase as determined by hybridization of site-directed mutants. *Biochemistry* 32(22):5842-5847.

Tobias KE i Kahana C (1995). Exposure to ornithine results in excessive accumulation of putrescine and apoptotic cell death in ornithine decarboxylase overproducing mouse myeloma cells. *Cell Growth Differ* 6(10):1279-1285.

Tohyama Y, Kameji T i Hayashi S (1991). Mechanisms of dramatic fluctuations of ornithine decarboxylase activity upon tonicity changes in primary cultured rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 202(3):1327-1331.

Tome ME, Fiser SM i Gerner EW (1994). Consequences of aberrant ornithine decarboxylase regulation in rat hepatoma cells. *J Cell Physiol* 158(2):237-244.

Tome ME, Fiser SM, Payne CM i Gerner EW (1997). Excess putrescine accumulation inhibits the formation of modified eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) and induces apoptosis. *Biochem J* 328:847-854.

Tsirka S i Coffino P (1992). Dominant negative mutants of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 267(32):23057-23062.

Tsuchiya T, Herbst JJ, Chen Q i Tso P (1997). Distribution and regulation of ornithine decarboxylase activity along the villus-crypt axis in the small intestine. *Biochim Biophys Acta* 1336:202-210.

Tsukamoto T, Kinoshita H, Hirohashi K, Kubo S, Otani S (1997). Human erythrocyte polyamine levels after partial hepatectomy. *Hepatology* 44:744-750.

Tsukamoto T, Kinoshita H, Hirohashi K, Kubo S, Tanaka H i Otani S (1999). Human erythrocyte polyamine levels after portal vein embolization. *Hepatology* 46:3178-3183.

Turchanowa L, Dauletbaev N, Milovic V i Stein J (2001). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs stimulate spermidine/spermine acetyltransferase and deplete polyamine content in colon cancer cells. *Eur J Clin Invest* 31(10):887-893.

**U**pp JR Jr, Saydjari R, Townsend CM Jr, Singh P, Barranco SC i Thompson JC (1988). Polyamine levels and gastrin receptors in colon cancers. *Ann Surg* 207(6):662-669.

Ulshen MH, Hoyt EC, Fuller CR, Gatei MA, Bloom SR i Lund PK (1996). Increased ileal proglucagon expression after jejunectomy is not suppressed by inhibition of bowel growth. *Dig Dis Sci* 41:677-683.

**V**an Daalen Wetters T, Macrae M, Brabant M, Sittler A i Coffino P (1989b). Polyamine-mediated regulation of mouse ornithine decarboxylase is posttranslational. *Mol Cell Biol* 9(12):5484-5490.

van Kranen HJ, van de Zande L, van Kreijl CF, Bisschop A i Wieringa B (1987). Cloning and nucleotide sequence of rat ornithine decarboxylase cDNA. *Gene* 60(2-3):145-155.

Van Steeg H, Van Oostrom CT, Hodemaekers HM, Peters L i Thomas AA (1991). The translation in vitro of rat ornithine decarboxylase mRNA is blocked by its 5' untranslated region in a polyamine-independent way. *Biochem J* 274(Pt 2):521-526.

Vauquelin LN (1791). Expériences sur le sperme humain. *Ann Chim* 9:64-80.

Verma AK, Erickson D i Dolnick BJ (1986a). Increased mouse epidermal ornithine decarboxylase activity by the tumour promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate involves increased amounts of both enzyme protein and messenger RNA. *Biochem J* 237(1):297-300.

Verma AK, Pong RC i Erickson D (1986b). Involvement of protein kinase C activation in ornithine decarboxylase gene expression in primary culture of

newborn mouse epidermal cells and in skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 46(12 Pt 1):6149-6155.

Villanueva VR i Mardon M (1988). Chromatography, flow injection analysis and electrophoresis in computer-assisted comparative biochemistry: its application and possibilities in clinical research. Preliminary studies on Crohn's disease. *J Chromatogr* 440:261-73.

von Essen C, Elworthy P, Hitchcock E (1989). Red blood cell polyamines in brain tumour patients. *Acta Neurochir (Wien)* 98(1-2):70-76.

**W**akabayashi Y, Yamada E, Yoshida T i Takahashi N (1995). Effect of intestinal resection and arginine-free diet on rat physiology. *Am J Physiol* 269(2 Pt 1):G313-318.

Wang JY, McCormack SA, Viar MJ, Wang H, Tzen CY, Scott RE i Johnson LR (1993). Decreased expression of protooncogenes c-fos, c-myc, and c-jun following polyamine depletion in IEC-6 cells. *Am J Physiol* 265:G331-338.

Wang JY, McCormack SA, Viar MJ i Johnson LR (1995). Inhibition of ornithine decarboxylase activity but not expression of the gene by cimetidine in intestinal mucosal cells. *J Pharmacol Exp Ther* 274:521-529.

Wang W, Liu LQ i Higuchi CM (1996). Mucosal polyamine measurements and colorectal cancer risk. *J Cell Biochem* 63(2):252-257.

Wang Y, Devereux W, Stewart TM i Casero RA Jr (1999). Cloning and characterization of human polyamine-modulated factor-1, a transcriptional cofactor that regulates the transcription of the spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase gene. *J Biol Chem* 274(31):22095-22101.

Wang Y, Devereux W, Woster PM i Casero RA (2001b). Cloning and characterization of the mouse polyamine-modulated factor-1 (mPMF-1) gene: an alternatively spliced homologue of the human transcription factor. *Biochem J* 359:387-392.

Wasylyk B, Hagman J i A G.-H (1998). Est transcription factors: nuclear effectors of the RAS-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 23:213-216.

Watanabe T, Shafman T i Kufe DW (1985). Requirement of spermidine for induction of both heme synthesis and globin transcription in murine erythroleukemia cells. *J Cell Physiol* 122(3):435-440.

Weiger TM, Langer T i Hermann A (1998). External action of di- and polyamines on maxi calcium-activated potassium channels: an electrophysiological and molecular modeling study. *Biophys J* 74(2):722-730.

Weisburger, JH (1971). Colon carcinogens: Their Metabolism and Mode of Action. *Cancer* 28:60-70.

Weiss T, Bernhardt G, Buschauer A, Jauch KW, Zirngibl H (1997). High-resolution reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of polyamines and their monoacetyl conjugates by fluorescence detection after derivatization with N-hydroxysuccinimidyl 6-quinolinyl carbamate. *Anal Biochem* 247(2):294-304.

Welters CF, Dejong CH, Deutz NE i Heineman E (1999). Effects of parenteral arginine supplementation on the intestinal adaptive response after massive small bowel resection in the rat. *J Surg Res* 85(2):259-266.

Wen L, Huang JK i Blackshear PJ (1989). Rat ornithine decarboxylase gene. Nucleotide sequence, potential regulatory elements, and comparison to the mouse gene. *J Biol Chem* 264(15):9016-9021.

Wery I, Kaouass M, Deloyer P, Buts JP, Barbason H i Dandrifosse G (1996). Exogenous spermine induces maturation of the liver in suckling rats. *Hepatology* 24(5):1206-1210.

Westergaard H (1998). Short Bowel Syndrome. En: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, eds. *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease* 6a ed. Philadelphia, PA: WB Saunders. Pàg:1548-1556.

White A i Bardocz S (1999). Estimation of the polyamine body pool: contribution by de novo biosynthesis, diet and luminal bacteria. En: Bardocz S i White A (eds.). *Polyamines in Health and Nutrition*. Kluwer Academic Publishers, Boston USA. Pàg:117-122.

Wingvist R, Mäkela TP, Seppänen P, Jänne OA, Alhonen-Hongisto L, Jänne J, Grzeschik KH i Alitalo K (1986). Human ornithine decarboxylase sequences map to chromosome regions 2pter----p23 and 7cen----qter but are not coamplified with the NMYC oncogene. *Cytogenet Cell Genet* 42(3):133-140.

Wollin A, Wang X i Tso P (1998). Nutrients regulate diamine oxidase release from intestinal mucosa. *Am J Physiol* 275(4):R969-975.

Worth LL, Cochran BJ i Haddox MK (1994). Phosphorylation of ornithine decarboxylase at both serine and threonine residues in the ODC-overproducing, Abelson virus-transformed RAW264 cell line. *Cancer Res* 54(15):3967-3970.

Wu G, Flynn NE i Knabe DA (2000). Enhanced intestinal synthesis of polyamines from proline in cortisol-treated piglets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E395-E402.

**X**ie X, Tome ME i Gerner EW (1997). Loss of intracellular putrescine pool-size regulation induces apoptosis. *Exp Cell Res* 230(2):386-392.

**Y**ano T, Oue S i Kagamiyama H (1998). Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5511-5515.

Yoshida M, Meksuriyen D, Kashiwagi K, Kawai G i Igarashi K (1999) Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA). Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon aug in oppa mRNA *J Biol Chem* 274(32):22723-22728.

Young DS, Pestaner LC i Gibberman V (1975). Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin Chem*; 21:1D-432D.

Zhao B, Kumar AP i Butler AP (2000). A negative regulatory element within the proximal promoter region of the rat ornithine decarboxylase gene. Mol Carcinog 29(4):212-218.





# 6 Annexes

## **6.1 Beques i projectes relacionats**

- 1998 Beca de la Academia de Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears.
- 1998 European Society of Parenteral and Enteral Nutrition Research Fellowship.
- 2000 EU COST Action 917 Short-Term Scientific Mission.
- 2000 Beca de la Generalitat de Catalunya 2000BEAI200196.

## 6.2 Altres publicacions

Farriol M, Venereo Y, Rosselló J, Gómez PA, Palao R, Orta X, Segovia-Silvestre T (2002). Effects of Taurine on Polymorphonuclear Phagocytosis activity in burned patients. *Amino acids* 23:441-445.

Farriol M, Fuentes F, Venereo Y, Solano I, Orta X, Segovia-Silvestre T (2001). Antioxidant Capacity in Severely Burned Patients. *Pathologie et Biologie* 49:227-231.

Farriol M, Segovia-Silvestre T, Venereo Y, Orta X (2000). Poliaminas en el tracto gastrointestinal. *Nutrición Hospitalaria* 15:45-50.

Farriol M, Venereo Y, Solano I, Orta X, Segovia-Silvestre T (2000). In Vitro Effects of Melatonin on Cell Proliferation in a Colon Carcinoma Line. *Journal of Applied Toxicology*;20:21-24.

Farriol M, Segovia-Silvestre T, Venereo Y, Orta X (1999). Importancia de las poliaminas: revisión de la literatura. *Nutrición Hospitalaria* 14:101-113.

## 6.3 Comunicacions a congressos

Segovia-Silvestre T, Pita AM, Orta X, Venereo Y, Farriol M. Intestinal Ornithine Decarboxylase in Short-Bowel Syndrome Patients with Oral Diet. 22<sup>nd</sup> ESPEN Congress. Septembre 2000. Madrid, Estat espanyol.

Segovia-Silvestre T, Pita AM, Orta X, Venereo Y, Farriol M. Study of erythrocyte polyamine levels in severely resected short-bowel patients. 7<sup>th</sup> Workshop of the EU COST 917 'Biogenically Active Amines in Food'. Abril 2000. Spa, Belgique.

Segovia-Silvestre T, Orta X, Venereo Y, Farriol M. Enhanced Colon Carcinoma Cell Proliferation with Addition of Putrescine. 21<sup>st</sup> ESPEN Congress. Septembre 1999. Stockholm, Sverige.

Segovia-Silvestre T, Venereo Y, Orta X, Farriol M. Efecto antioxidante de las poliaminas sobre la peroxidación de las membranas eritrocitarias. 14<sup>e</sup> Congr s SENPE. Maig 1999. Las Palmas, Estat espanyol.

Segovia-Silvestre T, Venereo Y, Orta X, Farriol M. Efecto de la adición de putrescina en el crecimiento de una línea celular de adenocarcinoma de colon. 14<sup>e</sup> Congr s SENPE. Maig 1999. Las Palmas, Estat espanyol.

Farriol M, Pastor C, Ruiz I, Venereo Y, Orta X, Segovia-Silvestre T. Estudio de los niveles de Retinol y  $\alpha$ -Tocoferol en pacientes con SIDA. 14<sup>e</sup> Congr s SENPE. Maig 1999. Las Palmas, Estat espanyol.

Farriol M, Venereo Y, Orta X, Segovia-Silvestre T. Effects of Taurine on Polymorphonuclear Phagocytosis Activity. 20<sup>th</sup> ESPEN Congress. Septembre 1998. Nice, France.

