

# Efecto de la $\delta$ -N-formil ornitina y de la $\epsilon$ -N-formil lisina sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa, enzima clave de la biosíntesis de las poliaminas

RODRÍGUEZ-PÁEZ, L.\*, NERI, C.D.\*, BAEZA, R.I.\* y WONG, R.C.\*

Departamento de Bioquímica  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I P N.  
Prol. de Carpio y Plan de Ayala  
Col. Sto. Tomás  
Apartado Postal 42-186  
11340 México, D.F.

RODRÍGUEZ-PAÉZ, L., C.D. NERI, R.I. BAEZA y R.C. WONG, 1997. Efecto de la  $\delta$ -N-formil ornitina y de la  $\epsilon$ -N-formil lisina sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa, enzima clave de la biosíntesis de las poliaminas *An. Esc. nac. Cienc. biol.*, Méx., 42: 21-30.

RESUMEN: Con base en consideraciones teóricas sobre inhibidores enzimáticos y antimetabolitos, nosotros supusimos que la  $\delta$ -N-formil ornitina podría comportarse como inhibidor de la ornitina descarboxilasa de hígado de rata, por lo que se sintetizó y se probó dicho compuesto sobre la actividad de esta enzima, habiéndose encontrado que esta sustancia efectivamente inhibió a la ornitina descarboxilasa en forma competitiva, con una  $K_i$  de 15 mM. En tanto que el homólogo inmediato superior, la  $\epsilon$ -N-formil lisina no tuvo efecto inhibitorio.

## INTRODUCCIÓN

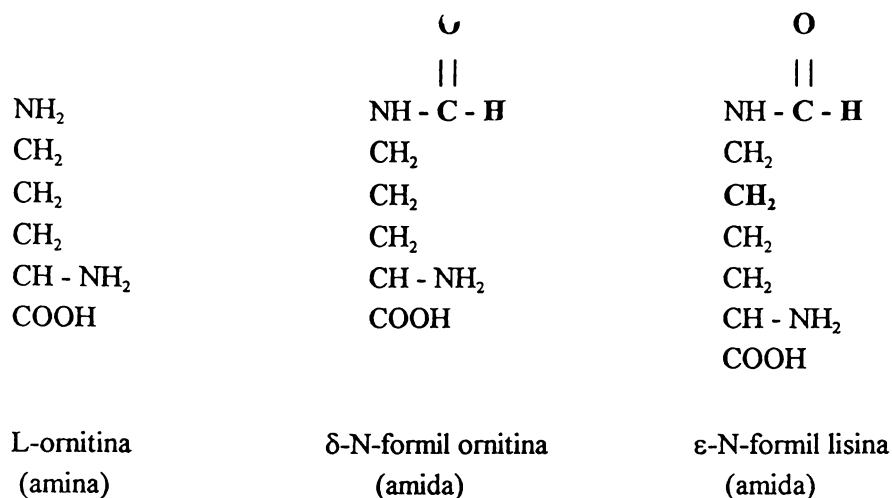
La ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.17) tiene una función clave en la biosíntesis de las poliaminas, putrescina, espermidina y espermina, moléculas indispensables para el crecimiento y la diferenciación celular (Pegg, 1986; Tabor y Tabor, 1984, 1985). La ornitina descarboxilasa (ODC) cataliza la descarboxilación de ornitina a putrescina, dependiente de fosfato de piridoxal. La detección de la actividad de la ODC en tejidos animales se publicó en 1968 (Russell y Snyder, 1968), y en 1969 Russell y Snyder (Russell y Snyder, 1969) encontraron que esta enzima se recambiaba con una vida media muy corta, entre 10 y 30 minutos, lo que estimuló el interés en esta enzima, ya que sugería su papel regulador en la vía biosintética de las poliaminas. Las características más importantes de la ODC son, su alta velocidad de recambio, que puede ser tan corta como 10 minutos (Davis, *et al.*, 1992; Ghoda, *et al.*, 1992) y su inducibilidad; su actividad en células de mamífero en reposo es muy pequeña, casi nula, pero incrementa su actividad en respuesta a una

---

\*Becarios de la DEDICT-COFAA y EDD.

gran variedad de estímulos de crecimiento, tales como hormonas, factores de crecimiento, estímulos regenerativos y promotores de tumores (Russell, 1980; Pegg, 1986). Estas características propias de la ODC, hacen que su expresión se encuentre fuertemente controlada en todas las células y por lo tanto que sea la enzima que regula la vía biosintética de las poliaminas.

El incremento en la biosíntesis de las poliaminas es un evento obligado, previo al crecimiento y diferenciación celular, ya sea de células en cultivo, tejidos en regeneración, tejidos embrionarios, células tumorales naturales o experimentales, tejidos hipertróficos, etc. (Russell, 1980; Pegg, 1986; Tabor y Tabor, 1984), y se considera que los inhibidores de la biosíntesis de las poliaminas podrían utilizarse como posibles agentes quimioterapéuticos para el control de estados patológicos de la proliferación celular, como cáncer y enfermedades parasitarias por protozoarios (Das *et al.*, 1995; Heby y Persson, 1990; Hunter *et al.*, 1990; Pegg, 1988; Sjoerdsman y Schechter, 1984). Debido a que la ODC es la enzima que regula la vía biosintética de las poliaminas, ha sido el blanco quimioterapéutico más desarrollado (Rodríguez-Páez *et al.*, 1987; Stevens y Stevens, 1980). El inhibidor más utilizado con fines terapéuticos, es la difluorometil ornitina (DFMO) (Kelloff *et al.*, 1994; Pegg, 1982, 1986, 1988; Sjoerdsma y Schechter, 1984), un inhibidor irreversible activado por la ODC (Metcalf *et al.*, 1978; Pegg, 1987), muy potente *in vitro*, y aunque en algunos casos se han obtenido buenos resultados clínicos, la DFMO es rápidamente eliminada por el organismo y no es capaz de penetrar a las células de algunos tejidos (Pegg, 1986, 1988; Sjoerdsma y Schechter, 1984). Esto ha llevado a la búsqueda de inhibidores más efectivos y que perduren más tiempo en el organismo; por ello, en este trabajo se estudia el efecto de la  $\delta$ -N-formil ornitina y la  $\epsilon$ -N-formil lisina, análogos estructurales de la ornitina (Fig. 1) como posibles inhibidores de la ODC de hígado de rata.



**Fig. 1.** Inhibidores estudiados y su relación estructural con la ornitina, sustrato natural de la ornitina descarboxilasa. Los grupos químicos señalados, indican las modificaciones hechas al sustrato.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar machos o hembras de aproximadamente 200 a 250 g de peso. Los reactivos: 2,2' p-fenilen-bis(5-fenil-oxazol) [POPOP], 2,5-difenil-oxazol (PPO) y ninhidrina, fueron de Merck. Fosfato de piridoxal, metil ornitina, ditioneitol, albúmina bovina, p-nitrofenol, urea, diacetilmonoxima, N,N'-diciohexil carbodiimida, de Sigma Chemical Co. Reactivo de Folin, de Sigma-México. Ornitina-1-<sup>14</sup>C, de Amersham. Amberlita IRC-50, de Mallinckrodt. Los demás reactivos utilizados fueron químicamente puros.

*Síntesis de la  $\delta$ -N-formil ornitina y de la  $\epsilon$ -N-formil lisina*

La síntesis de la  $\delta$ -N-formil ornitina (N-FO) y de la  $\epsilon$ -N-formil lisina (N-FL) se hizo por el método informado por Okawa y Hase (Okawa y Hase, 1963), La N-FO se obtuvo cristalina, con un rendimiento del 56% y un punto de fusión de 217°C (descomposición). Ambas determinaciones concuerdan con lo informado por Okawa y Hase (1963). La N-FL se obtuvo como un producto cristalino con un rendimiento del 38% y un punto de fusión de 225-226°C (descomposición). Lo cual concuerda también con lo informado por Okawa y Hase (1963).

*Obtención de la ornitina descarboxilasa por el método de Ono et al., 1972**a) Obtención del extracto enzimático*

Se inyectaron por vía intraperitoneal ratas Wistar con tioacetamida (150 mg/kg de peso), se sacrificaron 19 h después por dislocación cervical. Se extrajeron los hígados, se lavaron con agua fría y se pesaron inmediatamente. Se cortaron en pedazos pequeños y se homogeneizaron en el triple de su peso en volumen de regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.0, con 0.25 M de sacarosa, 0.1 mM de fosfato de piridoxal, 0.1 mM de EDTA y 5 mM de ditioneitol. Se centrifugó a 12,000  $\times$  g. Se pasó el sobrenadante resultante por manta de cielo húmeda, para eliminar la grasa del extracto enzimático.

*b) Purificación parcial de la ornitina descarboxilasa*

El extracto enzimático se centrifugó a 100,000 g por 1 h y el sobrenadante resultante se pasó por manta de cielo húmeda para eliminar la grasa. Se cambió el pH del medio a 4.6 por la adición lenta de ácido acético 2 M frío. Se incubó 30 min en frío, sin agitación y se recolectó el precipitado obtenido, por centrifugación a 12,000  $\times$  g. El precipitado se redisolvió en 15 ml de regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.0, con 0.1 mM de fosfato de piridoxal, 0.1 mM de EDTA y 5 mM de ditioneitol. Se centrifugó nuevamente a 12,000  $\times$  g. El sobrenadante obtenido fue la ornitina descarboxilasa semipurificada que se guardó en congelación a -70°C hasta su uso. Ésta es la solución enzimática (7.6 mg/ml) que se utilizó en todos los experimentos de este trabajo, cuya actividad específica fue de 0.14 nmol de CO<sub>2</sub>/min/mg de proteína.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un nmol de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> por min de incubación a 37°C, bajo las condiciones del ensayo.

### *Medición de la actividad de la ornitina descarboxilasa*

Para medir la actividad enzimática de la ODC, se empleó el método de Hayashi, 1983, modificado.

En frascos apropiados se mezclaron 0.1  $\mu\text{Ci}$  de L-ornitina-1- $^{14}\text{C}$  (25 mCi/ mmol), 0.1 ml de ornitina. HCl 0.8 mM, 0.1 ml de fosfato de piridoxal 0.1 mM, 0.1 ml de EDTA 0.1 mM, 0.1 ml de ditiotreitól 5 mM y regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.0 necesario para completar 0.7 ml. Se colocaron 110  $\mu\text{l}$  de KOH al 10% sobre una tira de papel filtro sostenida por el tapón del frasco. Se cerraron los frascos con tapones apropiados y se engargolaron. Se colocaron los frascos en baño maría a 37°C y se inició la reacción con la adición (por inyección) de 0.3 ml de la solución enzimática. Se dejó reaccionar 60 min a 37°C con agitación. Se detuvo la reacción por la adición (por inyección) de 0.5 ml de ácido perclórico 2 M. Se continuó incubando por 60 min más para permitir que el  $^{14}\text{CO}_2$  se absorbiera al papel filtro. Después, se desengargolaron los frascos y se pasó el papel filtro a un frasco con 10 ml de líquido de centello. Se midió la radiactividad del frasco en un contador de centelleo líquido Beckman 3801. Como testigos se emplearon un blanco de sustrato y un blanco de enzima, que carecen de sustrato o de enzima, respectivamente.

### *Efecto de la concentración del inhibidor sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa*

Se midió la actividad de la ornitina descarboxilasa en presencia de diferentes concentraciones, de 0-100 mM, de  $\delta$ -N-formil ornitina y  $\epsilon$ -N-formil lisina, de acuerdo con el método de Hayashi, 1983, modificado, descrito anteriormente. Los inhibidores se adicionaron en un volumen de 0.1 ml de solución acuosa.

### *Determinación del tipo de inhibición producido por la $\delta$ -N-formil ornitina y la $\epsilon$ -N-formil lisina sobre la ornitina descarboxilasa*

Se determinó la actividad de la ODC como se describió previamente, a diferentes concentraciones de L-ornitina (0-2 mM), en ausencia y en presencia de dos concentraciones diferentes del inhibidor, que a una concentración de 0.8 mM de L-ornitina producen aproximadamente el 30 y el 60% de inhibición, respectivamente.

## RESULTADOS

Todos los resultados mostrados en este estudio representan el promedio de por lo menos tres determinaciones.

### *Efecto de la $\delta$ -N-formil ornitina sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa de hígado de rata*

Para determinar si la N-FO se comportaba como inhibidor de la ODC, se midió la actividad de esta enzima a diferentes concentraciones de la N-FO. En la figura 2 se observa que la N-FO inhibe a la ODC de hígado de rata, ya que a una concentración de 20 mM, la N-FO inhibe un 10%, y a una concentración de 100 mM inhibe aproximadamente un 60%.

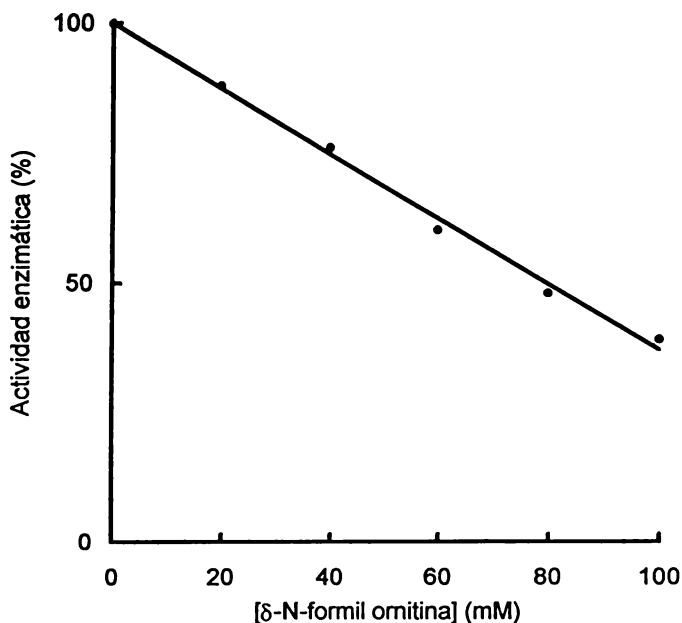


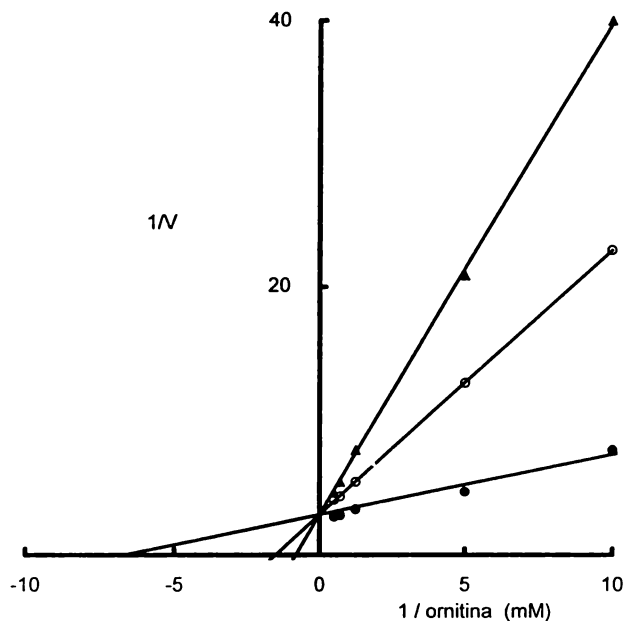
FIG. 2. Efecto de la concentración de la  $\delta$ -N-formil ornitina sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa de hígado de rata. La actividad de la ODC se determinó por el método de Hayashi (1983) midiendo la descarboxilación ( $\text{CO}_2$ ) en nmol/min. El 100% de la actividad enzimática equivale a 0.32 nmol de  $\text{CO}_2$  liberados por minuto (258 cpm/min). En todas las determinaciones se usó la misma concentración de enzima. ●, ODC +  $10^{-3}$  M de inhibidor.

Al obtener este efecto sobre la ODC, se procedió a determinar el tipo de inhibición que se produjo, para lo cual se hicieron determinaciones cinéticas a diferentes concentraciones de sustrato. La ODC presenta una cinética típica de Michaelis-Menten, con una  $K_m$  de 0.16 mM (gráfica no mostrada). Con esos datos se trazó la gráfica de la figura 3, de acuerdo con el método de Lineweaver-Burk (Dixon y Webb, 1979), y como se puede observar, se trata de una inhibición competitiva, lo cual implica que la N-FO produce una inhibición reversible por competencia con el sustrato por el sitio activo de la ODC.

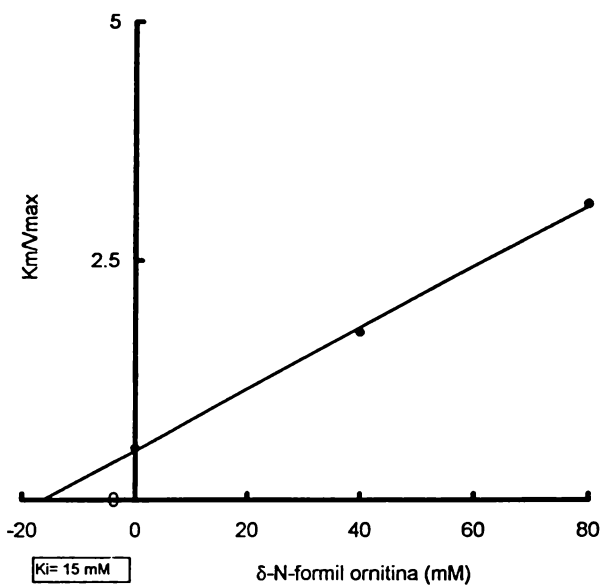
Se determinó la constante de inhibición ( $K_i$ ) de este sistema por el método de Dixon y Webb (1979), y se encontró que fue de 15 mM (Fig. 4).

#### *Efecto de la $\epsilon$ -N-formil lisina sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa de hígado de rata*

Ya que la N-FO es un inhibidor competitivo de la ODC, determinámos si su homólogo superior, la N-FL que tiene un grupo  $-\text{CH}_2-$  más en la cadena hidrocarbonada, era capaz de inhibir a la ODC. En la figura 5 se puede ver que esta sustancia prácticamente no inhibe a la ODC, ya que a una concentración de 100 mM, apenas produce una ligera inhibición. Esto indica que la introducción de un grupo metileno en la cadena hidrocarbonada de la N-FO, hace que se pierda la afinidad por el sitio activo de la ODC.



**Fig. 3.** Determinación del tipo de inhibición que produce la  $\delta$ -N-formil ornitina sobre la ornitina descarboxilasa de hígado de rata (método de Lineweaver-Burk). La actividad de la ODC se determinó como se indicó en la figura 2. ●, ODC. ○, ODC + 40 mM del inhibidor. ▲, ODC + 80 mM del inhibidor.



**Fig. 4.** Determinación de la constante de inhibición ( $K_i$ ) de la  $\delta$ -N-formil ornitina para la ornitina descarboxilasa de hígado de rata (método de Dixon y Webb, 1979). Los datos se tomaron de la figura 3.

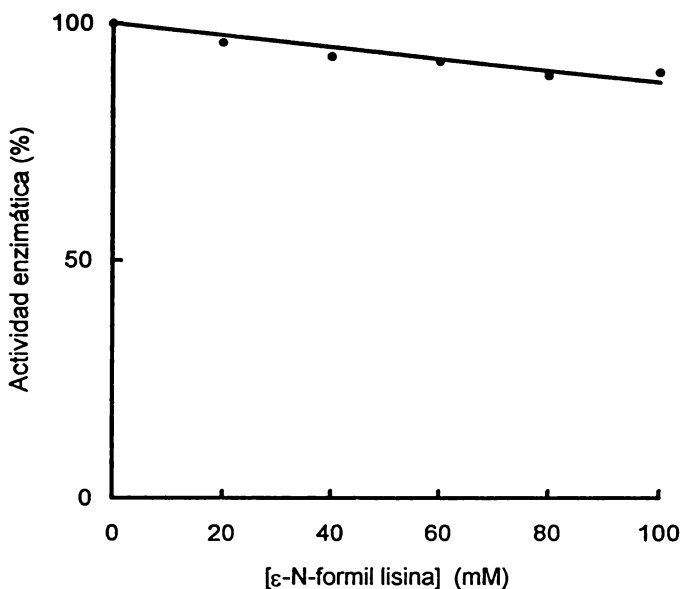


FIG. 5. Efecto de la concentración de la  $\epsilon$ -N-formil lisina sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa de hígado de rata. La actividad de la ODC se determinó como se indicó en la figura 2. ●, ODC +  $10^{-3}$  M de inhibidor.

## DISCUSIÓN

Se ha demostrado que un aumento de la síntesis de poliaminas es un hecho obligado previo a la proliferación celular, ya sea de células en cultivo, tejidos embrionarios, tejidos en regeneración o células tumorales; y se considera que los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas podrían servir, no sólo para dilucidar el mecanismo de acción de las poliaminas en la regulación del crecimiento y proliferación celular, sino que además podrían encontrar aplicación como posibles agentes quimioterapéuticos en la disminución del crecimiento de células tumorales. Con este propósito se ha tratado de inhibir a la ODC, por considerar que esta enzima participa en la reacción limitante de la biosíntesis de las poliaminas, y en teoría, esta inhibición podría conducir a la disminución de los niveles no sólo de putrescina, sino también de espermidina y espermina.

Una de las primeras sustancias que se sintetizaron con la idea de inhibir a la ODC fue la  $\alpha$ -metil ornitina, la cual resultó un potente inhibidor competitivo de esta enzima (Abdel Momen *et al.*, 1975), habiéndose demostrado que es capaz de inhibir a la ODC de células de hepatoma de rata en cultivo, con una consecuente disminución del crecimiento tumoral (Mamont *et al.*, 1976). La  $\alpha$ -difluorometil ornitina, inhibidor irreversible de la ODC (Metcalf *et al.*, 1978), es el inhibidor de la ODC más estudiado, es de los llamados inhibidores suicidas y también es capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales como consecuencia de la inhibición de la ODC (Mamont *et al.*, 1978; Pegg, 1988).

Con base en consideraciones teóricas, en este trabajo se estudiaron dos análogos estruc-

turales de la ornitina como posibles inhibidores de la ODC. Estas sustancias, la  $\delta$ -N-formil ornitina y la  $\epsilon$ -N-formil lisina, se sintetizaron y se probaron sobre la actividad de dicha enzima.

La primera sustancia que se supuso podría comportarse como inhibidor de la ODC fue la  $\delta$ -N-formil ornitina, basándonos en que previamente se había informado que algunos  $\delta$ -N-alquil derivados de la ornitina, como la N-metil y la N-etil ornitina tenían cierta actividad como inhibidores de la ODC (Bey *et al.*, 1978). Por tanto, se quería explorar si la introducción de un grupo formilo en el grupo  $\delta$ -amino de la ornitina, podría ser aceptado por el sitio activo de la ODC y, de ser así, dicha sustancia se debería comportar como inhibidor de esta enzima. Cabe mencionar que se han diseñado una gran cantidad de sustancias como posibles inhibidores de la ODC (Rodríguez-Páez *et al.*, 1987, revisión), sin embargo, en ningún caso se ha considerado la introducción de un grupo formilo en el grupo  $\delta$ -amino de la ornitina. De ahí la importancia del presente estudio, ya que si la  $\delta$ -N-formil ornitina resultara ser inhibidor de la ODC, aunque no fuera muy potente, se contaría con una nueva estructura química a partir de la cual se podrían obtener nuevos derivados, con la idea de incrementar su afinidad por la enzima, aumentar su permanencia en el organismo o disminuir su toxicidad. Con el objeto de hacer el estudio comparativo, se consideró también sintetizar y estudiar el homólogo inmediato superior, que sería la  $\epsilon$ -N-formil lisina para determinar cuál es el efecto que produce el aumentar un átomo de carbono en la molécula.

El hecho de que la  $\delta$ -N-formil ornitina inhiba a la ODC en forma competitiva indica que a pesar de la introducción del grupo formilo en la posición  $\delta$  de la ornitina, el sitio activo de la ODC conserva su afinidad por esta molécula; en tanto que la  $\epsilon$ -N-formil lisina, con un átomo de carbono más, pierde la afinidad por el sitio activo, ya que esta sustancia no produjo inhibición sobre la enzima.

Estos hallazgos muestran que el sitio activo de la ODC estudiada, acepta modificaciones en el grupo  $\delta$ -amino de la ornitina y específicamente acepta que el grupo  $\delta$ -amino sea transformado en una amida, lo cual, desde el punto de vista químico, es estupendo, ya que esto nos permitirá en el futuro introducir grupos alquilantes en esta posición del sustrato, con la idea de obtener inhibidores irreversibles dirigidos al sitio activo de esta enzima. Así por ejemplo, se podría introducir un grupo cloroformilo en el  $\delta$ -amino de la ornitina, y con esta sustancia se esperaría que, por similitud estructural con el sustrato, este posible inhibidor entraría al sitio activo de la enzima, y si el grupo alquilante quedara cerca de algún grupo nucleofílico, se produciría una alquilación de la enzima y consecuentemente una inhibición irreversible. Con lo que se esperaría una mayor inhibición y por lo tanto mayor efecto farmacológico.

Así, además de que la  $\delta$ -N-formil ornitina mostró ser un buen inhibidor de la ODC, esta sustancia abre muchas posibilidades para el diseño y obtención de otros derivados acilados como posibles inhibidores irreversibles dirigidos al sitio activo de esta enzima, con mucho más posibilidades de llegar a ser utilizados como posibles fármacos para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una alta proliferación celular.

## CONCLUSIONES

Se estudiaron dos análogos estructurales de la ornitina como posibles inhibidores de la ornitina descarboxilasa: la  $\delta$ -N-formil ornitina y la  $\epsilon$ -N-formil lisina.



Los resultados mostraron que la  $\delta$ -N-formil ornitina inhibe a la ornitina descarboxilasa en forma competitiva con una  $K_i$  de 15 mM, lo que indica que a pesar de la introducción del grupo formilo en la posición  $\delta$  de la ornitina, el sitio activo de la ornitina descarboxilasa conserva su afinidad por esta molécula; en tanto que el homólogo inmediato superior, la  $\epsilon$ -N-formil lisina, con un átomo de carbono más, pierde la afinidad por el sitio activo, ya que esta sustancia no produjo inhibición sobre la enzima.

Estos hallazgos muestran que el sitio activo de la ornitina descarboxilasa estudiada, acepta modificaciones en el grupo  $\delta$ -amino de la ornitina y específicamente acepta que el grupo  $\delta$ -amino sea transformado en una amida, lo cual, desde el punto de vista químico, es estu- pendo, ya que esto nos permitirá en el futuro introducir grupos alquilantes en esta posición del sustrato, con la idea de obtener inhibidores irreversibles dirigidos al sitio activo de esta enzima.

### SUMMARY

Using a theoretical approach for the design of enzymatic inhibitors and antimetabolites, we supposed that  $\delta$ -N-formyl ornithine, would behave like a rat liver ornithine decarboxylase inhibitor. That is why, we synthesized and tested this compound on the activity of this enzyme, observing that this substance really inhibited ornithine decarboxylase in a competitive way, with a  $K_i$  15 mM, whereas the one carbon higher homologous, the  $\epsilon$ -N-formyl lysine, showed no inhibitory effect.

### BIBLIOGRAFÍA

- ABDEL-MONEM, M.M., N.E. NEWTON and C.E. WEEKS, 1974. Inhibitors of polyamine biosynthesis. 1.  $\alpha$ -methyl-ornithine, an inhibitor of ornithine decarboxylase. *J. Med. Chem.*, **17**: 447-450.
- BEY, P., C. DANZIN, V. VAN DORSSELAER, P. MAMONT, M. JUNG and C. TARDIF, 1978. Analogues of ornithine as inhibitors of ornithine decarboxylase. New deductions concerning the topography of the enzyme's active site. *J. Med. Chem.*, **21**: 50-55.
- DAS, B., B. GUPTA and R. MADHUBALA, 1995. Combined action of inhibitors of polyamine biosynthetic pathway with a known antimalarial drug chloroquine on Plasmodium falciparum. *Pharmacol. Res.*, **31**: 189-193.
- DAVIS, R.H., D.R. MORRIS and P. COFFINO, 1992. Sequestered end products and enzyme regulation: the case of ornithine decarboxylase. *Microbiol Rev.*, **56**:280-290.
- DIXON, M. and E.C. WEBB, 1979. Enzyme inhibitors and activation. En: *Enzymes*. 3rd. ed. Longman Group Ltd. London, pp. 332-381.
- GHODA, L., D. SIDNEY, M. MACRAE and P. COFFINO, 1992. Structural elements of ornithine decarboxylase required for intracellular degradation and polyamine-dependent regulation. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 2178-2185.
- GILAD, G.M. and V.H. GILAD, 1992. Polyamines in neurotrauma. Ubiquitous molecules in search of a function. *Biochem. Pharmacol.*, **44**: 401-407.
- HAYASHI, S., 1983. Ornithine decarboxylase (rat liver). En: *Methods in enzymology. Polyamines*. **94**. Tabor, H. y Tabor, C.W., Eds. Academic Press, Inc. New York.
- HEBY, O. and L. PERSSON, 1990. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukariotic cells., *TIBS*. **15**: 153-158.
- HUNTER, K.J., C.A. M. STROBOS and A.H. FAIRLAMB, 1990. The interaction of trypanocidal drugs with polyamine and trypanothione metabolism. *Biochem. Soc. Trans.*, **18**: 1094-1096.

- KELLOFF, G.J., C.W. BOONE, V.E. STEELE, J.R. FAY, R.A. LUBET, J.A. CROWELL and C.C. SIGMAN, 1994. Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. *J. Cell. Biochem.*, **20**: 1-24.
- MAMONT, P.S., P. BOHLEN, P. MCCANN, P. BEY, F. SCHUBER and C. TARDIF, 1976. methyl ornithine, a potent competitive inhibitor of ornithine decarboxylase, blocks proliferation of rat hepatoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**: 1626-1630.
- MAMONT, P.S.P., M.C. DUCHESNE, J. GROVE and P. BEY, 1978. Antiproliferative properties of DL- $\alpha$ -difluoromethylornithine in cultured cells. A consequence of the irreversible inhibition of ornithine decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**: 58-66.
- METCALF, B.W., P. BEY, C. DANZIN, M.J. JUNG, P. CASARA, and J.P. VEVERT, 1978. Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C. 4.1.1.17) by substrate and product analogues. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**: 2551-2553.
- OKAWA, K. and S. HASE, 1963. The synthesis of N-formyl basic amino acid. *Bull., Chem. Soc. Japan*, **36**: 754.
- ONO, M., H. INOUE, F. SUZUKI and Y. TAKEDA, 1972. Studies on ornithine decarboxylase from the liver of thioacetamide-treated rats. Purification and some properties. *Biochem. Biophys. Acta*, **284**: 285-297.
- PEGG, A.E. and P.M. MCCANN, 1982. Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.*, **243**: C212-C221.
- PEGG, A.E., 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukariotes. *Biochem., J.* **234**: 249-262.
- \_\_\_\_\_, 1987. Decarboxylation of difluoromethylornithine by ornithine decarboxylase. *Biochem., J.* **241**: 305-307.
- \_\_\_\_\_, 1988. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as target for chemotherapy. *Cancer Res.*, **48**: 759-774.
- RODRÍGUEZ-PÁEZ, L., I. BAEZA-RAMÍREZ, C. WONG-RAMÍREZ y R. YÁÑEZ-AVILA, 1987. Inhibidores de la biosíntesis de las poliaminas. *Acta Médica*, **23**: 19-38.
- RUSSELL, D.H. and S.H. SNYDER, 1968. Amine synthesis in rapid growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regeneration rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **60**: 1420-1427.
- \_\_\_\_\_, 1969. Amine synthesis in regenerating rat liver: extremely rapid turnover of ornithine decarboxylase. *Mol. Pharmacol.*, **5**: 253-262.
- RUSSELL, D.H. 1980. Ornithine decarboxylase as a biological and pharmacological tool. *Pharmacology*, **20**: 117-129.
- SJOERDSMA, A. and P.J. SCHECHTER, 1984. Chemotherapeutic implications of polyamine biosynthesis inhibition. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **35**: 287-300.
- STEVENS, L. and E. STEVENS, 1980. Inhibitors of the biosynthesis of putrescine, spermidine and spermine. En: *Polyamines in biomedical research*. Gaugas, J.M., ed. J. Wiley & Sons. Chichester. New York. Brisbane. Toronto, pp. 167-183.
- TABOR, C.W. and TABOR, Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**: 749-790.
- \_\_\_\_\_, 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.*, **49**: 81-99.