



Revisión de tema

Papel de las poliaminas en la transducción de señales intracelulares: posibles proyecciones de uso clínico en el manejo de las distrofias musculares por medio de su inhibición con difluorometilornitina.

Polyamines role in intracellular signals transduction: possible projections for clinical use in muscular dystrophies' management through its inhibition with difluoromethylornithine.

Austin-Ward, Enrique Daniel

Sección De Genética, Complejo Hospitalario Metropolitano Dr. Arnulfo Arias Madrid, Panamá.

Palabras Claves:

Poliaminas, señales intracelulares, calcio intracelular, energía; distrofia muscular.

Key words:

Polyamines, intracellular signals, intracellular calcium, energy, muscular dystrophy.

Correspondencia:

Dr. Enrique Austin-Ward.

Correo electrónico:

austin_ward@yahoo.com

Declaración de conflicto de interés:

El autor declara que no existen conflictos de interés relacionados con este trabajo.

Resumen

Las distrofias musculares de origen genético son muy diversas y, tanto su diagnóstico preciso como su manejo, suponen un reto importante. En cuanto a este último aspecto, no obstante el desarrollo en proceso de nuevas estrategias a nivel molecular para su tratamiento, las herramientas con que se cuenta para este propósito son limitadas, y pocas veces pueden influir de manera efectiva para evitar el deterioro progresivo que muchos de estos pacientes experimentan. Además, las terapias de última generación no abarcan la gran diversidad de estas patologías y no se espera que estén disponibles a corto plazo para la mayoría de los pacientes.

El propósito del artículo es mostrar el papel de las poliaminas, actores ubicuos en el metabolismo intracelular tal vez poco conocidos; cómo están involucrados en los procesos fisiológicos y patológicos, y cómo también pudiesen estar involucrados en la fisiopatología de las distrofias musculares. Su inhibición controlada, mediante Difluorometilornitina (DFMO), pudiese constituir un mecanismo para enlentecer o eliminar el deterioro muscular de estos pacientes, al utilizarse como una herramienta dentro del arsenal de las ya existentes.

Abstract

Muscular dystrophies of genetic origin are very diverse and, both their precise diagnosis and their management represent an important challenge. Regarding this last aspect, despite the development in process of new strategies at the molecular level for its treatment, the tools available for this purpose are limited, and can rarely influence effectively to avoid the progressive deterioration that many of these patients experience. In addition, the latest-generation therapies do not cover the great diversity of these pathologies and are not expected to be available in the short term for most patients.

The purpose of the article is to show the role of polyamines, ubiquitous actors in intracellular metabolism, perhaps little known; how they are involved in physiological and pathological processes, and how they could also be involved in the physiopathology of muscular dystrophies. Its controlled inhibition, by difluoromethylornithine (DFMO), could be a mechanism to slow or eliminate the muscle deterioration of these patients, by being used as a tool within the arsenal of those already existing.

INTRODUCCIÓN

Las poliaminas (espermina, espermidina, putrescina, cadaverina) son moléculas endógenas cuyo precursor es la ornitina. La ornitina es un metabolito de la arginina, el cual es un aminoácido de suma importancia para la detoxificación del ion amonio a través del ciclo de la urea [1].

Las poliaminas son policationes orgánicas con grupos amino los cuales se encuentran protonados al máximo a valores fisiológicos de pH.

En la síntesis de las poliaminas, la putrescina es la primera en formarse a partir de la L-ornitina por medio de la ornitina decarboxilasa (ODC), la enzima limitante en este proceso.

Las dos enzimas claves en el metabolismo de las poliaminas son la ornitina decarboxilasa (ODC) y la S-adenosilmetioninidecarboxilasa. La ODC tiene la vida media

más corta conocida entre las enzimas de los mamíferos (10 minutos) y su actividad responde con rapidez a numerosos estímulos, lo cual constituye un factor importante en materia de regulación. Incrementos de 10 a 200 veces en la actividad de la ODC siguen con rapidez a la administración de hormona de crecimiento, corticosteroides, testosterona o factor epidérmico de crecimiento cuando se estimulan células de mamífero en cultivo.

Aunque se ha asociado a las poliaminas principalmente al crecimiento y diferenciación celulares tanto en eucariotas como en procariotas [2-3], existen numerosas evidencias de que participan en otros numerosos procesos intracelulares. Por ejemplo, las poliaminas son capaces de regular la actividad de varias enzimas. En ese contexto, Le Petit y cols. han demostrado la estimulación por parte de las poliaminas de la actividad de la triacilglicerol lipasa (TAGL) en cerebros de rata [4], y Huang y cols. la estimulación de la glicógeno sintasa fosfatasa en el músculo esquelético de rata [5], entre otras.

Debido a sus cargas positivas, las poliaminas pueden interactuar con el ADN que es un polianión y modificar el grado de condensación del mismo, tal y como lo han evidenciado Smirnov y cols. [6]. Así se ha observado la formación de complejos con otro polianión como lo es el ATP; según Meksuriyen y cols. los complejos ATP-Mg²⁺-espermina pueden jugar un rol importante en algunas reacciones dependientes de ATP, al aumentar la actividad de las enzimas que utilizan este último [7]. Las poliaminas también intervienen en la organización del citoesqueleto, ya que, como ha sido demostrado por Anderson y cols [8] y por Grant y cols [9] respectivamente, estas pueden inducir el ensamblaje de moléculas de tubulina y de actina.

Las poliaminas y la homeostasis del calcio intracelular

Otro de los procesos en los cuales se ha demostrado que las poliaminas se encuentran involucradas, es en la homeostasis del calcio intracelular, y evidencias de este rol han sido presentadas en diversos trabajos. Por ejemplo, en 1983, Koenig y cols. demostraron que las poliaminas median procesos calcio-dependientes tales como endocitosis, transporte de hexosas y de amino ácidos, producidos luego de la estimulación con andrógenos y con agentes beta adrenérgicos de la corteza renal de ratones [10]. Cuando las células fueron estimuladas con testosterona en dichos experimentos, hubo una respuesta de la ODC tan temprana como a los 30s, lo cual provocó a su vez un rápido ascenso en los niveles de poliaminas, seguida de la movilización temprana de flujos de calcio y el transporte subsecuente de los metabolitos mencionados. Esta respuesta fue bloqueada por la difluorometilornitina (DFMO), un inhibidor específico de la ODC [11]. Una respuesta similar tanto con estimulación beta-adrenérgica como androgénica fue observada en experimentos posteriores en miocitos cardíacos de rata [12].

Otras evidencias de que las poliaminas están involucradas en la homeostasis del calcio intracelular provienen de su rol en el proceso de captación de calcio por parte de

las mitocondrias [13]. Estos organelos participan en la regulación de los niveles de calcio intracelular sirviendo como tampones que permiten mantener niveles adecuados de calcio citosólico. Rustembeck y cols. y de Rottenberg y cols. han demostrado que la espermina aumenta la captación y la retención de calcio por parte de las mitocondrias [14-15].

Por otro lado, la regulación de algunas enzimas vincula a las poliaminas con la homeostasis del calcio. La ornitina descarboxilasa (ODC) es una enzima regulada por calcio, y según Ginty y Seidel, esta inducción es dependiente de calmodulina [16].

Además, las poliaminas son capaces de modular el metabolismo de los fosfatidil inosítoles, los cuales están involucrados en la homeostasis del calcio a partir de los reservorios de este ion sensibles a IP₃ [17]. Por ejemplo, experimentos realizados por Bueb y cols. en mastocitos peritoneales de rata demostraron que la administración de espermina a una concentración de 10mM produce un aumento por encima del 100% en los niveles de IP₃ y de IP₄, que es máxima a los 5s [18]. Además, la espermidina es un inhibidor de la IP₃-5-fosfatasa, enzima que es capaz de remover la masa de IP₃ [19].

Por otro lado, evidencias presentadas por Zarka y cols., han demostrado que las poliaminas (principalmente la espermina) estimulan la unión de la rianodina a su receptor en el músculo esquelético [20].

Papel de las poliaminas en procesos patológicos

Las poliaminas se encuentran involucradas en patologías en las cuales ocurre un exceso de proliferación, tal y como sucede en el cáncer. En dichas enfermedades se observa un incremento de las mismas, tanto a nivel intracelular como en los fluidos corporales [21].

Por otro lado, se ha descrito que los pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne tienen niveles de poliaminas intracelulares [22] y urinarios [23] que son elevados si se comparan a dichos pacientes con sus homólogos sanos de la misma edad y sexo, aunque no hay datos claros sobre estos valores en células musculares. Lo mismo sucede en casos de miastenia gravis [24], una enfermedad neuromuscular en la cual ocurre debilidad y atrofia muscular progresiva, debido a una denervación secundaria a una destrucción de los receptores nicotínicos de acetilcolina por mecanismos autoinmunes [25].

Las poliaminas y la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

Las distrofias musculares han sido definidas como un grupo de desórdenes determinados genéticamente en los cuales ocurre una degeneración progresiva de los músculos esqueléticos sin anomalías estructurales asociadas de los sistemas nerviosos central o periférico. Estas han sido clasificadas en base a la distribución clínica y severidad de la debilidad muscular y el patrón de herencia. La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es un trastorno recesivo ligado al cromosoma X caracterizado

por debilidad progresiva de los músculos esqueléticos, con cambios patológicos asociados en el músculo, debido a la deficiencia en la proteína distrofina (26). Los síntomas de presentación más frecuentes son la marcha anormal, las caídas frecuentes, dificultad para subir escaleras, inicio tardío de la ambulación, hipotonía, dificultad para gatear, marcha en la punta de los pies y fatiga excesiva [27].

El examen histopatológico en estos pacientes revela inicialmente variaciones en el tamaño de la fibra muscular, áreas focales de degeneración y de fibras en regeneración; posteriormente se observa el predominio de la degeneración tisular con pérdida gradual de fibras y reemplazo de las mismas por tejido conectivo y tejido adiposo. Esta degeneración de las fibras involucra un proceso de necrosis [28].

Desde el punto de vista fisiopatológico, se ha observado que en las células de pacientes con DMD hay un exceso de calcio intracelular, una disminución en el contenido de ATP [29] y estas células poseen característicamente un pH elevado [30].

Aunque pudiera haber varios mecanismos involucrados en la degeneración tisular de la DMD [31], se postula que el proceso de necrosis estaría desencadenado por proteólisis excesiva y señales apoptóticas mediadas por un exceso en el calcio intracelular y por una disminución en la producción de ATP celular.

Se cree que la sobrecarga de calcio en pacientes con DMD está relacionada con la inestabilidad de la membrana celular debido a la falta de distrofina, una proteína estructural del citoesqueleto, lo cual la hace frágil y susceptible a disrupciones, permitiendo la entrada de calcio extracelular. Otros datos ligan efectivamente al calcio a la fisiopatología de la enfermedad de Duchenne. Robert y cols. trabajando en ratones mdx han determinado que luego de la depolarización con potasio de los mismos, hay un déficit en el manejo subcelular del calcio a nivel mitocondrial, comparado con los controles [32]. Kuznetsov y cols. a su vez demostraron que existe un deterioro en la fosforilación oxidativa mitocondrial en músculos esqueléticos de ratones mdx y sugieren que este deterioro podría estar relacionado con la sobrecarga de calcio a este nivel [33].

Existen evidencias de que el exceso de calcio intracelular produce un deterioro en la producción de ATP en las células musculares, como lo que ocurre en la paradoja del calcio (the calcium paradox) en el músculo cardíaco [34]. Esta paradoja consiste en que al producirse una depleción súbita en el flujo del calcio hacia un tejido, y una subsecuente reposición del mismo, ocurre un ingreso excesivo de este ion y se desencadena un daño celular masivo. Trabajos de Touraki y Beis en tejidos de rana sometidos a la paradoja del calcio, demostraron que al medir el contenido de los fosfatos de alta energía luego de la reperusión en la que ocurre una entrada masiva de calcio, hay una disminución abrupta en el contenido celu-

lar de los mismos [35]. Así mismo, Ziegelhoffer y cols. han encontrado una prevención parcial de la paradoja del calcio (en especial en lo que respecta al contenido de ATP) en corazones de rata aislados y perfundido utilizando diltiazem, un bloqueador de los canales de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico [36].

Estos datos apoyan la relación entre la disminución en la producción de ATP y niveles elevados de calcio intracelular en la patogénesis de la necrosis celular tal y como pudiera ocurrir en las células distróficas. De hecho, Bhattachayra y cols. en trabajos realizados en hamsters distróficos han reportado una reversión en el deterioro de la fosforilación oxidativa y de la sobrecarga de calcio luego de utilizar quelantes de este ion [37].

¿Podrían estar las poliaminas involucradas en estos fenómenos de ingreso masivo de Ca^{++} a la célula? Según nos dice Koenig y cols., las poliaminas podrían estar involucradas en estos procesos, puesto que han descrito su participación en la paradoja del calcio en corazones de rata [38]. Este grupo observó que la inhibición de la ODC previene el flujo excesivo de calcio intracelular y sus consecuencias. Además, según He y cols. la acumulación de poliaminas está relacionada con una disminución en el contenido de ATP en células de ratón FM3A [39]. Sjöholm y cols. han reportado que la depleción de poliaminas en células de insulinoma producen un aumento en la producción de ATP [40].

Otro hallazgo particular en las líneas celulares distróficas tanto en humanos como de ratón, lo constituye el hecho de que los niveles basales de Inositol-3-fosfato (IP_3) están aumentados entre dos y tres veces, comparados con los controles normales y que en la línea celular distrófica humana (RCDMD), los niveles de IP_3 permanecen elevados luego de 200s luego de la depolarización de estas células con potasio [41], a diferencia de lo que ocurre en líneas celulares humanas y de ratón normales en las cuales la depolarización con potasio induce un aumento temporero-dependiente en las concentraciones de IP_3 , los cuales retornan a sus niveles basales después de 60s. Existen reservorios de calcio sensibles a IP_3 en las células musculares [42].

¿Está el exceso de calcio intracelular (Ca^{++}) de las células distróficas asociado a estos aumentos en la masa de IP_3 ? Y por otro lado, ¿están las poliaminas ligadas a este aumento en la masa de IP_3 en las células musculares normales y distróficas o interactúan con los receptores de IP_3 de manera que están asociadas directa y/o indirectamente con el aumento de las concentraciones de calcio intracelular? Por las evidencias del efecto de las poliaminas sobre el aumento de la captación y retención del calcio a nivel mitocondrial, las interacciones con receptor de rianodina y relación con el metabolismo del IP_3 y eventualmente con su receptor, así como por otras evidencias que hemos mencionado, estas podrían tener un efecto sobre la homeostasis del calcio intracelular y/o sobre las cascadas de transducción de señales que regulan la expresión génica en células musculares.

Proyecciones de uso Clínico

Dadas estas consideraciones, la inhibición parcial de las poliaminas, conducente a la disminución de sus niveles intracelulares probablemente pueda utilizarse en el manejo de la DMD, así como de otras distrofias musculares que compartan un mismo mecanismo fisiopatológico (Ver figura 1), así como se utiliza su inhibición en el manejo de otras patologías donde estas intervienen, pero en las cuales su relación es con los fenómenos de sobre crecimiento.

En cuanto a la DMD, el tratamiento más comúnmente utilizado son los corticoides. Estos probablemente actúan mediante varios mecanismos de acción, pero se considera que sus principales beneficios están basados en su capacidad para disminuir la respuesta inmunológica contra las células musculares que están en proceso de sufrir necrosis, permitiendo en cierto grado la conservación de la masa muscular [43].

Una serie de estrategias de última generación incluyen las terapias tales como el salto de exones (exon skipping) [44], lectura más allá de los codones de término (stop codon readthrough) [45] y la edición genómica (genome editing) [46] y las proyecciones de la terapia génica, por medio del reemplazo del gen de la distrofina afectado por uno normal, como lo demuestran diversos ensayos clínicos [47]. La inhibición de las poliaminas podría intervenir en la detención o en el enlentecimiento del proceso de necrosis, no solo en las distrofinopatías, sino en otras afecciones musculares en las cuales el mecanismo fisiopatológico sea similar e involucre otras proteínas de membrana del músculo, como es el caso de las calpainopatías, disferlinopatías, sarcoglicanopatías entre otras, mediante el mejoramiento en la producción de ATP y normalización del pH intracelular, utilizando inhibidores específicos de la ODC tales como la difluorometilornitina (DFMO). El uso de este inhibidor ha resultado ser efectivo en el tratamiento de infecciones producidas por tripanosomas africanos [48] y el tratamiento para la eliminación del exceso de vello facial en las mujeres [49]. Igualmente se encuentran en proceso numerosos estudios clínicos para su uso en el tratamiento del cáncer [50], ya que se ha demostrado su eficacia por su efecto inhibidor de la poliaminas, normalmente asociadas a fenómenos de crecimiento. Su toxicidad es relativamente baja y es un medicamento aprobado por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Además es un medicamento de bajo costo, en comparación con las nuevas terapias en desarrollo, que se prevé demorarán todavía en estar disponibles para la mayoría de los pacientes, y si se demuestra que tiene efectos positivos puede ser un coadyuvante al tratamiento de las distrofias musculares en general, en conjunto con los esteroides, para disminuir la rapidez de la progresión de la enfermedad, al mejorar los niveles de producción de energía y disminuir los efectos nocivos del exceso de calcio intracelular. No obstante, su uso con este propósito requerirá un proceso de investigación riguroso, incluyendo estudios en animales y ensayos clínicos en todas sus fases.

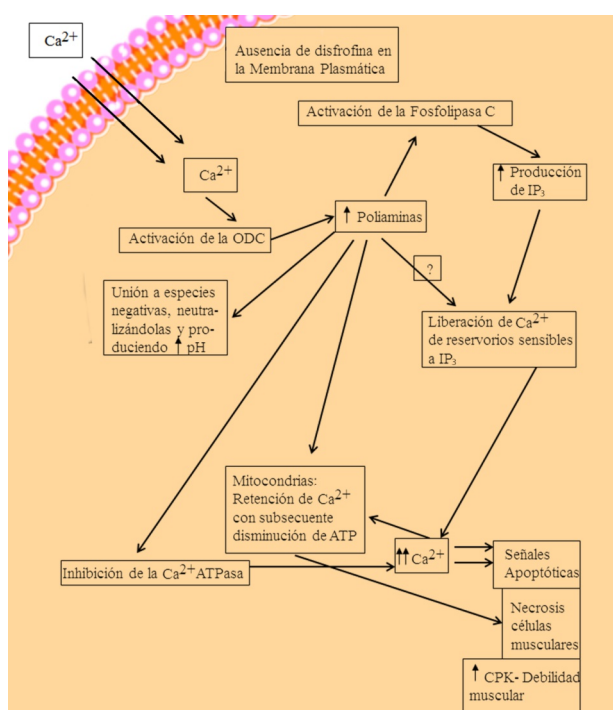


Figura 1. Esquema del posible mecanismo fisiopatológico en células musculares distróficas. Un aumento en la permeabilidad al calcio producida por una deficiencia de distrofina aumentaría la producción de poliaminas las cuales a su vez mediarían una retroalimentación positiva para el aumento del Ca^{2+} intracelular por varios mecanismos y subsecuente disminución de la producción de energía y producción de señales apoptóticas.

CONCLUSIÓN

Las poliaminas son moléculas ubicuas con múltiples funciones que pueden ser consideradas como mediadores en numerosas actividades celulares, moduladores enzimáticos y segundos mensajeros en la cascada de transducción de señales a nivel intracelular. Así como intervienen en numerosos procesos fisiológicos, es probable que sean parte de la fisiopatología de muchas afecciones frecuentes donde está involucrado el crecimiento celular, tales como el cáncer, y de otras muchas en que hay alteraciones en el metabolismo del calcio intracelular, tal como ocurriría en las distrofias musculares.

Su control o inhibición parcial, pudiese ejercer un efecto modulador de la homeostasis del calcio que pudiese constituir una herramienta para el manejo de las distrofias musculares, para retardar la progresión del deterioro progresivo que se ve en estos pacientes. La difluorometilornitina es utilizado como agente farmacológico para tratar varias afecciones y se pudiese utilizar también en el caso de las distrofias musculares. Esta hipótesis debe ser sometida a la experimentación clínica correspondiente según exigen las normas.

REFERENCIAS

- [1] Visek WJ. Arginine needs physiological state and usual diets. A reevaluation. *J Nutr* 1986;116(1):36-46
- [2] Canellakis ZN, Marsh LL, Bondy PK. Polyamines and their derivatives as modulators in growth and differentiation. *Yale J Bio Med* 1989; 62(5):481-91.
- [3] Mathy C, Carlier P, Yerna N, Rorive G. Polyamines and cardiovascular hypertrophy in experimental hypertension. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1987; 80(6):777-82.
- [4] Le Petit J, Nobili O, Boyer J. Simulation of brain lipase activity by polyamines. Comparison with the effect of ACTH. *Pharmacol Biochem Beba* 1986; 24(6): 1543-5.
- [5] Huang LC, Chang LY. Stimulation of muscle glycogen synthase phosphatase by polyamines. *Biochim Biophys Acta* 1980; 613(1):106-15.
- [6] Smirnov IV, Dimitrov SI, Makarov VL. Interaction of polyamines with chromatin and DNA: formation of compact structures. *Mol biol (Mosk)* 1987; 21(5): 1411-21.
- [7] Hougaard DM, Del Castillo AM, Larsson LI. Endogenous polyamines associate with DNA during its condensation in mammalian tissue. A fluorescence cytochemical and immunocytochemical study on polyamines in fetal rat liver. *Eur J Cell Biol* 1988; 45(2): 311-4
- [8] Anderson PJ, Bardocz S, Campos R, Brown DL. The effect of polyamines on tubulin assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 132(1):147-54.
- [9] Grant NJ, Oriol-Audit C, Dickens MJ. Supramolecular forms of actin induced by polyamines; and electron microscopic study. *Eur J Cell Biol* 1983; 30(1):67-73.
- [10] Koenig H, Goldstone AD, Lu CY. Polyamines are intracellular messengers in the beta-adrenergic regulation of Ca^{2+} fluxes, (Ca^{2+} i) and membrane transport in rat heart myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153(3):1179-85
- [11] Kohno H, Sasaki K, Yamaguchi M, Ohkubo Y. Spermine modulates calcium flux through the rat erythrocyte membrane. *Biol Pharm Bull* 1997; 20(2):153-7.
- [12] Ventura C, Ferroni C, Flamigni F, Stefanelli C, Capogrossi MC. Polyamine effects on (Ca^{2+} i) homeostasis and contractility in isolated rat ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1994; 267(2Pt2):H587-92.
- [13] McMillin-Wood J, Wolkowicz PE, Chu A, Tate CA, Goldstein MA, Entman ML. Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart. *Biochim Biophys Acta* 1980; 591(2):251-65.
- [14] Rustenbeck I, Eggers G, Munster W, Lenzen S. Effect of spermine on mitochondrial matrix calcium in relation to its enhancement of mitochondrial calcium uptake. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194(3): 1261-8.
- [15] Rottemberg H, Marbach M. Regulation of Ca^{2+} transport in brain mitochondria. I. The mechanism of spermine enhancement of Ca^{2+} uptake and retention. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1016(1):77-86.
- [16] Ginty DD, Seidel ER. Polyamine-dependent growth and calmodulin-regulated induction of ornithine decarboxylase. *Am J Physiol* 1989; 256(2Pt1):G342-8.
- [17] Smith CD, Snyderman R. Modulation of inositol phospholipid metabolism by polyamines. *Biochem J* 1988; 256:125-130.
- [18] Bueb J-L, Da Silva A, Mousli M, Landry Y. Natural polyamines stimulate G-proteins. *Biochem J* 1992; 282:545-550.
- [19] Huang C, Liang NC. Increase in cytoskeletal actin induced by inositol 1,4-bisphosphate in saponin-permated pig platelets. *Cell Biol Int* 1994; 18(8): 797-804.
- [20] Zarka A, Shoshan-Barmatz V. The interaction of spermine with the ryanodine receptor from skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1108(1):13-20.
- [21] Hayase R, Eguchi K, Sekiba K. Polyamine levels in gynecologic malignancies. *Acta Med Okayama* 1985; 39(1):35-45.
- [22] Mollica F, Li Volti S, Rapisarda A, Longo G, Pavone L, Vanella A. Increased erythrocyte spermine in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 1980; 14:1196-1198.
- [23] Russell DH, Stern LZ. Altered polyamine excretion in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 1981; 31:80-83.
- [24] Szathmary I, Selmei L, Szobor A, Molnar J. Altered polyamine levels in skeletal muscle of patients with myasthenia gravis. *Clin Neuropathol* 1994;13(4):181-4
- [25] Hoedemaekers AC, van BredaVriesman PJ, De Baets MH. Myasthenia gravis as a prototype autoimmune receptor disease. *Immunol Res* 1997; 16(4):341-54.
- [26] Dubowitz V. The Muscular Dystrophies. En: *Muscle Disorders in Childhood*. 2da Edición. WB Saunders Company. Londres. 1995. Págs.: 34-65.
- [27] Robbins SL, Cotran KS, Kumar V. Distrofias Musculares. En: *Patología Estructural y Funcional*. 3ra Edición. Nueva Editorial Interamericana. México 1988 Pág. 1284.
- [28] Camina F, Novo-Rodríguez MI, Rodríguez-Segade S, Castro-Gago M. Purine and carnitine metabolism in muscle of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chim Acta* 1995; 243: 151-164. Published erratum appears in *Clin Chim Acta* 1996 15; 252:105.
- [29] Frass M, Toifl K, Leixnering W. Adenine metabolism in erythrocytes of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Eur Neurol* 1983;22(5):380-4.
- [30] Kemp GJ, Taylor DJ, Dunn JF, Frostick SP, Radda GK. Cellular energetics of dystrophic muscle. *J Neurol Sci* 1993; 116(2):201-6.
- [31] Marks AR. Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol* 1997; 272:H597-605.
- [32] Robert V, Massimino ML, Tosello V, Marsault R, Cantini M, Sorrentino V, Pozzan T. Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdx myotubes. *J Biol Chem* 2000(epub ahead of print).
- [33] Kuznetsov AV, Winkler K, Wiedemann FR, von Bosanyi P, Dietzmann K, Kunz WS. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of

- the dystrophin-deficient mdx mouse. *Mol Cell Biochem* 1998; 183(1-2):87-96.
- [34] Poole-Wilson PA, Harding DP, Bourdillon PD, Tones MA. Calcium out of control. *J Mol Cell Cardiol* 1984; 16(2):175-87.
- [35] Touraki M, Beis I. Alterations in the energy metabolism of the isolated perfused frog heart during calcium depletion and subsequent repletion. *J Comp Physiol (B)* 1991; 161(1):85-92.
- [36] Ziegelhoffer A, Ravingerova T, Tribulova N, Slezak J, Okolicay J, Tregerova V, Kruse EG, Bartel S. Partial prevention of calcium paradox in isolated perfused rat hearts by diltiazem. *Biomed Biochim Acta* 1989; 48(2-3):S96-101.
- [37] Bhattacharya SK, Johnson PL, Thakar JH. Reversal of impaired oxidative phosphorylation and calcium overloading in the skeletal muscle mitochondria of CHF-146 dystrophic hamsters. *Mol Chem Neuropathol* 1998; 34(1):53-77.
- [38] Koenig H, Goldstone AD, Trout JJ, Lu CY. Polyamines mediate uncontrolled calcium entry and cell damage in rat heart in the calcium paradox. *J Clin Invest* 1987; 80(5):1322-31.
- [39] He Y, Kashiwagi K, Fukuchi J, Terao K, Shirahata A, Igarashi K. Correlation between the inhibition of cell growth by accumulated polyamines and the decrease of magnesium and ATP. *Eur J Biochem.* 1993 Oct 1; 217(1):89-96.
- [40] Sjöholm A, Welsh N, Hoftiezer V, Bankston PW, Hellerström C. Increased glucose oxidation and contents of insulin and ATP in polyamine-depleted rat insulinoma cells (RINm5F). *Biochem J.* 1991 Jul 15; 277 (Pt 2):533-40.
- [41] Estrada M, Liberona JL, Miranda M, Jaimovich E. Aldosterone and testosterone mediated intracellular calcium response in skeletal muscle Cell cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279(1):E132-9.
- [42] Liberona JL, Powell JA, Shenoi S, Petherbridge L, Caviedes R, Jaimovich E. Differences in both inositol 1,4,5-triphosphate mass and inositol 1,4,5-triphosphate receptors between normal and dystrophic skeletal muscle cell lines. *Muscle Nerve* 1998; 21:902-909.
- [43] Kliegman RM, Stanton BF, St Geme III JW, Schor NF, Behrmam RE. Duchenne and Becker Muscular Dystrophies. En: *Nelson Textbook of Pediatrics*. 20th Edition 2016. Editorial Elsevier. Tomo 2do. Págs.: 2976-2979.
- [44] Kole R, Krieg AM. Exon skipping therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Jun 29; 87:104-7.
- [45] Shimizu-Motohashi Y, Komaki H, Motohashi N, Takeda S, Yokota T, Aoki Y. Restoring Dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy: Current Status of Therapeutic Approaches. *J Pers Med.* 2019 Jan 7; 9(1). pii: E1
- [46] Wang JZ, Wu P, Shi ZM, Xu YL, Liu ZJ. The AAV-mediated and RNA-guided CROS'R/Cas9 system for gene therapy of DMD and BMD. *Brain Dev* 2017Aug; 39(7):547-556.
- [47] Wakefield PM, Tinsley JM, Wood MJ, Gilbert R, Karpati G, Davies KE. Prevention of the dystrophic phenotype in dystrophin/utrophin-deficient muscle following adenovirus-mediated transfer of a utrophin minigene. *Gene Ther* 2000; 7(3):201-4.
- [48] McCann PP, Bacchi CJ, Clarkson AB Jr, Seed Jr, Nathan HC, Amole BO, Hutner SH, Sjoerdsma A. Further studies on difluoromethylornithine in African trypanosomes. *Med Biol* 1981;59(5-6):434-40
- [49] Kumar A, Naguib YW, Shi YC, Cui Z. A method to improve the efficacy of topical eflornithine hydrochloride cream. *Drug Deliv.* 2016 Jun; 23(5):1495-501.
- [50] Gutiérrez LG, Hernández-Morales M, Núñez L, Villalobos C. Inhibition of Polyamine Biosynthesis Reverses CA3+ Channel Remodeling in Colon Cancer Cells. *Cancers (Basel).* 2019 Jan 13; 11(1). pii: E83