

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA

**PROPIEDADES BIOQUIMICAS
DE LA ARGINASA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
THALIA ADRIANA DIAZ JASSO

MEXICO, D. F.

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTÁ TESIS SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DEL
MAESTRO EN CIENCIAS, JOSÉ DOMINGO MENDEZ F.

I N D I C E

	PAG.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVO	6
Generalidades	7
Catabolismo de aminoácidos	9
Ruta del α -cetoglutarato	12
Ciclo de la urea	16
Interacciones entre el ciclo de la urea y otras vias metabólicas	20
Ciclo del ácido cítrico	24
Localización intracelular	30
Arginasa hepática	36
Inhibición	39
Inactivación proteolítica	48
Inactivación por tratamiento ácido y por acción del agente complejante, EDTA	54
Inmovilización	60
Arginasa en:	
Hígado de rata	69
Hígado de gallina	73
Hígado de conejo	73
Hígado de vaca	78
Isoenzimas de arginasa en hígado de rata	86
Efecto de la dieta proteínica y de la inanición	91
Efecto de la adrenalectomía	97
Efecto del zinc en la dieta	101
Regulación hormonal	103
Ontogénesis de arginasa	114
Estudios genéticos de la síntesis de arginasa	119
Arginasa extrahepática	
Isoenzimas (propiedades)	123
Arginasa en: Riñón de rata	132
Intestino delgado de la rata	140
El cerebro de ratón	148
La epidermis de ratón	151
La prostata ventral de rata	152
El suero	156
Función de la arginasa extrahepática	158
Función en: El riñón e intestino delgado	158
La glándula mamaria lactante	160
El desarrollo embrionario	168
El cerebro	169
La piel	173
La glándula tiroide	174

Arginasa en el Hombre: Activación e inmovilización	176
El hígado y eritrocitos	188
fibroblastos	196
placenta	201
suero	205
Estudios inmunológicos de la arginasa	208
Arginasa y enfermedades	211
Arginasa en el diagnóstico clínico	211
Deficiencia de arginasa	216
Terapia en la deficiencia de arginasa	217
Distribución de la arginasa	219
Método representativo para la purificación y actividad de arginasa	220
 CONCLUSIONES	 224
GLOSARIO	225
BIBLIOGRAFIA	226

INDICE DE FIGURAS

Fig.		Pag.
1	Rutas de entrada de los aminoácidos en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (51)	11
2	Rutas que conducen al α -cetoglutarato (51)	12
3	Principales rutas para la conversión de arginina en ácido glutámico en los mamíferos (51)	13
4	Ruta principal de conversión de histidina en ácido glutámico, en los mamíferos. El tetrahidrofolato FH ₄ actúa como aceptor del grupo forminio (51)	14
5	Catabolismo de la prolina y de la hidroxiprolina. Conversión de prolina en ácido glutámico (51)	15
6	Ciclo de la urea que muestra las etapas de citoplásmica y mitocondrial (51)	18
7	Fórmulas de las poliaminas (51)	21
8	Biosíntesis de poliaminas (51)	23
9	Ciclo del ácido cítrico y su interacción con otras vías metabólicas (51)	25
10	Liberación de la arginasa microsomal por KCl (58)	32
11	Formación de arginina a partir de fuente endógena y exógena (74)	52
12	Representación esquemática de la disociación y reasociación de enzimas oligoméricas (78)	64
13	Variaciones de la actividad de arginasa en la glándula mamaria de rata (94)	161
14	Variaciones en la actividad total de arginasa hepática y en el peso de hígado, durante la preñez, lactancia e involución (94)	162
15	Variaciones en la actividad específica de arginasa hepática durante la preñez, lactancia e involución (11)	163
16	Desarrollo paralelo de las actividades de arginasa y ornitina amino transferasa en la glándula mamaria	

	de rata durante la lactancia tardía (11)	165
17	Actividad de la arginasa en diferentes tejidos de rata durante la preñez y lactancia (17)	167
18	Dependencia de la actividad de arginasa sobre la concentración de arginina (20)	178
19	Esquema que representa la relación entre los derivados unidos a la matriz (U.M.) de la arginasa de hígado humano (80)	180
20	Inhibición de la arginasa nativa por ornitina a pH 7.5 (41)	183
21	Inhibición de la arginasa dimérica por ornitina a pH 7.5 (41)	184
22	Esquema que representa la preparación de derivados diméricos unidos a la matriz de la arginasa de hígado humano (149)	187
23	Efecto del pH sobre la actividad de la arginasa de eritrocitos de hígado humano (96)	189

INDICE DE TABLAS

Tabla		Pag.
1	Distribución y comparación de la actividad de arginasa en diferentes tejidos de rata	27
2	Distribución de arginasa en tejidos de rata adulta	29
3	Actividades de arginasa en la mucosa del intestino delgado (duodeno, yeyuno e ileón) comparadas con las actividades del hígado y de la parte glandular del estómago	30
4	Centrifugación diferencial de los homogeneizados de hígado de rata	32
5	Localización intracelular de arginasa a partir de diferentes fuentes	36
6	Efecto de los L-aminoácidos en la actividad de arginasa de hígado de oveja	41
7	Efecto de L-aminoácidos en la actividad de arginasa en homogeneizados de cerebro de oveja	43
8	Efecto de la L-indsopicina natural o DL-indsopicina sintética en la actividad de arginasa de homogeneizado de hígado de rata	45
9	Inhibidores (purinas y pirimidinas) de la arginasa de hígado de bovino	46
10	Comparación de los tiempos de vida media de cinco diferentes enzimas	48
11	Distribución de la producción e hidrólisis de arginina a partir de fuente endógena y exógena	54
12	Efecto de los aminoácidos en la actividad de la arginasa nativa e inmovilizada	62
13	Influencia de la preincubación con iones manganeso y con dodecil sulfato de sodio (DSS) o EDTA sobre la actividad de la arginasa nativa e inmovilizada	63

14	Efectos de pH, remoción de Mn y sustitución por Co en la actividad enzimática y en la conducta de sedimentación de la arginasa de hígado de rata	71
15	Peso molecular de la arginasa de hígado de rata y de su unidad polipeptídica, determinado por velocidad de sedimentación y por equilibrio de sedimentación en ultracentrifugación	71
16	Composición de aminoácidos de la arginasa de hígado de rata	72
17	Composición de aminoácidos de la arginasa de hígado de rata comparada con la arginasa de hígado de gallina	75
18	Purificación de la arginasa en hígado de conejo	76
19	Activación de la arginasa de hígado de conejo purificada y activación de su extracto crudo	77
20	Purificación de la arginasa de hígado de vaca	79
21	Composición de aminoácidos de la arginasa de hígado de vaca	81
22	Dependencia de la actividad de arginasa en homogeneizados de hígado de vaca sobre la concentración de iones manganeso	81
23	Actividad de los análogos de arginina como sustratos para la arginasa de hígado de vaca	84
24	Constantes de Michaelis-Menten para la hidrólisis de L-arginina a través de la arginasa de hígado de rata	86
25	Purificación de la arginasa de hígado de rata	88
26	Efectos de la dieta proteínica en el peso corporal, peso hepático, contenido de proteína en el hígado y en la excreción de urea	92
27	Efectos de la dieta proteínica en los niveles de las enzimas del ciclo de la urea en el hígado de rata	93
28	Efecto de la adrenalectomía sobre las actividades de las enzimas del ciclo de la urea en el hígado de rata	99
29	Efecto de la hidrocortisona sobre el contenido de arginasa renal y hepática en ratas	103
30	Purificación de arginasa a partir de glándulas mamarias lactantes de rata	124
31	Activación de la arginasa de la glándula mamaria	126
32	Distribución de isoenzimas en tejidos de rata	129
33	Especificidad de sustrato de las isoenzimas de arginasa aisladas por electroforesis anódica	130
34	Resumen comparativo de algunas propiedades de las isoenzimas de arginasa en tejidos de rata (24, 10)	132
35	Distribución subcelular de la arginasa del riñón de rata	133
36	Purificación de la arginasa de riñón de rata a partir de la fracción mitocondrial	134
37	Inactivación de la arginasa de riñón de rata por	

	iones metálicos	137
38	Especificidades relativas de sustrato para la arginasa de hígado y riñón de rata	138
39	Inhibidores de la actividad de arginasa de riñón e hígado de rata	139
40	Síntesis total de urea en el hígado, mucosa intestinal (duodeno, yeyuno e ileón) y mucosa glándular, ventricular de rata	141
41	Purificación de la arginasa de intestino delgado de rata	142
42	Especificidad de sustrato de la arginasa de intestino delgado de rata	144
43	Efecto de varios L-aminoácidos sobre la actividad de arginasa de intestino delgado de rata	145
44	Propiedades de las arginasas de hígado y cerebro de ratón	150
45	Actividad de arginasa en las fracciones soluble y particulada de la epidermis de ratón	152
46	Distribución de la actividad de arginasa en el sobrenadante y precipitado obtenido de próstata ventral, riñón e hígado de rata	153
47	Constantes de Michaelis para las enzimas de próstata ventral, riñón e hígado de rata	154
48	Comparación de las principales propiedades de la arginasa hepática y extrahepática en diferentes animales	155
49	Actividad de arginasa en el suero de diferentes mamíferos	156
50	Actividad de arginasa en sueros de diferentes animales	157
51	Distribución de las actividades de arginasa, transamidinasa y ornitina aminotransferasa en diferentes regiones del cerebro de rata	170
52	Actividades de arginino succinato sintetasa, arginino succinato liasa y arginasa, y síntesis de urea en diferentes regiones del cerebro de rata	172
53	Tratamiento del tetrámero inmovilizado de arginasa con EDTA	177
54	Propiedades enzimáticas de los monómeros, dímeros y tetrámeros de arginasa unidos a la matriz	180
55	Producción y pureza de las preparaciones de arginasa a partir del hígado y eritrocitos humanos	188
56	Constantes de Michaelis y de inhibición para las fracciones de arginasa de hígado humano	193
57	Purificación de la arginasa de hígado y eritrocitos humanos (15)	195
58	Actividad de la arginasa (nmol urea/h/mg de proteína) en diferentes tejidos humanos (4)	197
59	Constantes de Michaelis y pH's óptimos para las arginasas de tejidos humanos (4)	197
60	Actividad de arginasa en fibroblastos de piel humana cultivados en medio conteniendo suero fetal	

	de ternera o suero humano (1)	200
61	Purificación de la arginasa de placenta humana	202
62	Purificación de la arginasa a partir del suero humano (5)	204
63	Comparación de las principales propiedades de la arginasa en células o tejidos humanos	207
64	Deficiencia de arginasa en cinco pacientes diferentes (204)	218
65	Purificación de la arginasa a partir del hígado de rata	223

RESUMEN

.La arginasa (E.C. 3.5.3.1) cataliza la reacción de hidrólisis de la arginina en ornitina y urea tanto en el hígado como en diferentes tejidos extrahepáticos.

.Las isoenzimas de la arginasa presentan propiedades bioquímicas distintas; sus concentraciones y su localización intracelular varían dependiendo del tejido u órgano.

.La importancia de la arginasa extrahepática radica en su relación con la biosíntesis de poliaminas pues se sabe que estas moléculas son factores de crecimiento, división, proliferación, y diferenciación celular.

.La arginasa se encuentra presente en 70 % de los sueros humanos normales en una concentración muy pequeña. La actividad de esta enzima aumenta en el suero de pacientes con distintas enfermedades por lo que se ha sugerido que su determinación puede ser utilizada en el diagnóstico clínico.

.La actividad de arginasa hepática "in vivo" está influenciada por la ingestión de proteína, concentración de glucagón, y por hormonas esteroides.

.Los diferentes estudios inmunológicos y genéticos realizados en deficiencia de arginasa en el hígado y eritrocitos humanos han revelado la existencia de dos genes estructurales que codifican para dos enzimas distintas; una identificada en el riñón y la otra en el hígado y eritrocitos humanos.

INTRODUCCION

La arginasa (L-arginina amidinohidrolasa, E.C. 3.5.3.1) es la enzima que cataliza la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina y urea. Su función principal y mejor conocida es la que realiza dentro del ciclo de la urea, mecanismo que tiene lugar en el hígado de organismos ureotélicos (excretan el nitrógeno amínico en forma de urea).

Además de la función hepática, la actividad de arginasa esta asociada con la regulación de diversos procesos celulares. Esta enzima se encuentra presente en diferentes tejidos de mamíferos y en otros sistemas vivientes, lo que constituye un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de procesos básicos de la función celular.

La arginasa es más abundante en el hígado de mamíferos, en donde su actividad es mayor, mientras que cantidades menores y variables se detectan en tejidos no hepáticos.

En el hombre se ha demostrado actividad de arginasa en el riñón (1), placenta (2,3), corazón (4), sangre (5), eritrocitos (6-13), linfocitos y granulocitos leucémicos (14), en líneas de células tumorales en cultivo (15), en suero, tanto en personas sanas (16,17), como en pacientes con enfermedades del hígado (18,19) y otros padecimientos diversos (20-23), así como los factores de suero requeridos para la inducción de arginasa en macrófagos (24) etc.

A la arginasa distribuida ampliamente en diferentes tejidos (10) extrahepáticos se le atribuye la función principal, entre

otras, de facilitar la disponibilidad de ornitina para la biosíntesis de poliaminas tales como la espermidina en la glándula mamaria lactante además de estar involucrada en éste tejido en la síntesis de prolina incrementando la producción de la leche (25); participa también en la biosíntesis de putrescina en la epidermis asociada a la producción de prolina, glutamato y proteínas queratinosas (26); síntesis de espermidina y espermina en el intestino delgado para la proliferación de células epiteliales (27); biosíntesis de putrescina en tiroides (28), etc.

En estos y otros tejidos como el cerebro (29), el ciclo de la urea no es operativo ya que no todas las enzimas que participan en este mecanismo están presentes o algunas de ellas sólo se detectan en cantidades muy bajas.

El posible papel de la arginasa extrahepática en la biosíntesis de poliaminas parece especialmente atractivo ya que estas moléculas policatiónicas tienen un papel clave en el crecimiento de células y tejidos (30).

Una variedad de especies de ratas y ratones son los que han servido para realizar la mayor parte de los estudios existentes sobre arginasa debido a la disponibilidad de sus tejidos en cantidades adecuadas, a tiempos convenientes y bajo condiciones experimentales propias. Estos mamíferos inferiores son utilizados como una herramienta para facilitar los estudios definitivos en material humano.

En ratas se ha detectado actividad de arginasa en el intes-

tino delgado (27,31), pulmón y cerebro (33,34), tiroides (28), bazo, corazón, piel, músculo esquelético y glándula submaxilar (33), páncreas (32, 33), riñón (32, 35), glándula mamaria lactante (36-38), útero (39), etc.

En ratones la enzima se ha localizado en la epidermis (26), cerebro (29) y otros tejidos. Además se ha observado que la arginasa es inducida en macrófagos mediante el cultivo de células peritoneales (40,41) y células de bazo de ratón (42).

Otros mamíferos que han sido mejor estudiados son los bovinos (42-46), terneras (47), cabras (48), conejos (49) y cerdos (50).

Las distintas formas moleculares o isoenzimas de arginasa identificadas en los tejidos presentan diferencias en algunas propiedades básicas como por ejemplo movilidad electroforética, solubilización, sensibilidad al calor, etc. Se ha considerado la posibilidad de que éstas isoenzimas puedan formarse a partir de una forma nativa durante los procesos de aislamiento y purificación utilizados (4).

La comprensión del papel fisiológico de las isoenzimas de arginasa conferidas a un compartimento celular dado es de especial interés debido precisamente a la función catalítica que éstas puedan desempeñar.

Los estudios clínicos y biológicos del control genético y origen de la arginasa realizados recientemente con relación a la argininemia (deficiencia de arginasa en el hígado) e hiperargininemia (deficiencia de arginasa en eritrocitos), han servido

como base para el tratamiento y comprensión de éstas y otras enfermedades congénitas relacionadas con el ciclo de la urea.

OBJETIVO

Revisar y comparar las propiedades de la arginasa y sus isoenzimas presentes en los diferentes tejidos de mamíferos, particularmente en el hombre ya que la actividad de esta enzima en procesos metabólicos distintos al ciclo de la urea, ha sido relacionada con fenómenos de crecimiento y proliferación celular así como con diferentes enfermedades.

Generalidades

La arginasa cuya existencia sospechó Richet en 1894, fue descubierta y descrita por Kosel y Dakin en 1904. Su presencia fue primeramente detectada en el hígado de los mamíferos como la enzima terminal del ciclo de la urea mecanismo postulado por H. A. Krebs en 1932 (51).

En 1941 Vincet encontró arginasa en el plasma humano o suero (SARG). A partir de entonces la actividad de esta enzima en suero y en los diferentes tejidos se ha venido midiendo en relación con diferentes enfermedades del hígado y de otros órganos para su diagnóstico.

De una manera general, la arginasa esta ausente en el hígado de organismos uricotélicos: reptiles (lagartos y serpientes) y aves cuya excreción de nitrógeno amínico esencialmente, se hace en forma semisólida como suspensión de ácido úrico sólido. Entre las aves, con poca actividad de arginasa hepática (52), se la encuentra abundantemente en el riñón. Muchos animales acuáticos, tales como los peces teleosteos, excretan nitrógeno proteico en forma de amoniaco (organismos amonotélicos). Los anfibios ocupan una posición intermedia.

El renacuajo que es un animal acuático, excreta amoniaco. Después de la metamorfosis la rana adulta excreta urea, ya que el hígado adquiere las enzimas necesarias para esto.

Los granos en germinación, levaduras, ciertos mohos (*Neurospora crassa*) y bacterias contienen gran cantidad de arginasa.

La naturaleza química de la enzima no se conoce totalmente; su actividad se aumenta o se disminuye en presencia de algunos cationes (cofactores), principalmente con Mn^{+2} .

El rango de pH óptimo para la arginasa está entre 9.3 y 10.0. Es una enzima que hidroliza uniones C-N no peptídicas y que tiene afinidad por el sustrato L-arginina y no así por los isómeros D-arginina y L-homoarginina. Un gran número de sustratos portadores de un resto guanidínico-sustituído han sido ensayados para señalar la especificidad de la arginasa; los derivados monosustituídos, no pueden ser sustratos de la arginasa si no cumplen las siguientes condiciones:

-Tener en el grupo guanidínico un radical NH_2 libre y un carboxilo asociado a un grupo NH_2 u ^{-}OH en alfa.

-Que haya una cierta separación entre el primero y el segundo. Se tiende a admitir que la arginasa se combina al resto guanidínico de una parte y otra y que la orientación de su grupo activo descansa sobre una atracción que el manganeso parece ejercer sobre el grupo carboxilo y amino o hidróxilo del sustrato. El metal se comportara como un agente coordinador entre la enzima y el sustrato por medio de sus últimos grupos (52).

Fuera de la arginina la arginasa actúa sobre la canavanina, de forma moderada sobre cupleina (protamina de Hareng) y la monobenzoil-arginina. No ataca a la dibenzoil-arginina, al ester metílico de la arginina, al ácido guanidin acético (glicociamina), a creatina y a la creatinina (52).

La arginasa tiene una estructura oligomérica, siendo un tetrámero que consiste en cuatro monómeros, cada uno de los cuales tiene un peso molecular de 30,000-40,000 y un ión Mn^{+2} íntimamente ligado.

La arginasa mejor caracterizada es la enzima de hígado de rata la cual tiene un peso molecular de 120,000 Daltones (53,54) y un pH óptimo alrededor de 9.5 (55). La enzima de hígado humano tiene un peso molecular de 107,000 y su pH óptimo es 9.3 (8).

La arginasa de hígado de rata tiene la propiedad de no ser desnaturalizada fácilmente por ácido. Esta resistencia a la desnaturalización por ácido se considera como una indicación de la existencia de isoenzimas. De todas maneras el proceso de inactivación por ácido a una temperatura de 0°C, causa la disociación de la enzima en subunidades que tienen pesos moleculares de 64,000 y 32,000 a pH 4 y 2, respectivamente (55). La reactivación depende de la temperatura (37°C en amortiguador neutro) y de la concentración de iones Mn^{+2} en el medio (55).

El tratamiento con ácido etilen diamino tetra acético (EDTA) ocasiona la inhibición de la arginasa por remoción de Mn^{+2} , dissociándola en 4 subunidades enzimáticamente inactivas con un peso molecular cercano a 30,000. La inhibición puede ser completamente reversible con la adición de iones Mn^{+2} en el medio (54).

-Catabolismo de aminoácidos.

Para la degradación oxidativa de los 20 diferentes aminoácidos que se encuentran en las proteínas, existen 20 secuencias multienzimáticas diferentes en los vertebrados. Todas estas

secuencias convergen en unas pocas rutas terminales que conducen al piruvato, al acetil-CoA o a los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Tal como se muestra en la Fig.1, los esqueletos carbonados de diez de los aminoácidos rinden en último término acetil-CoA, bien por la vía del piruvato o la del acetoacetil-CoA, otros cinco aminoácidos se convierten en α -cetoglutaratato, tres rinden succinil-CoA y dos producen oxalacetato. Dos aminoácidos, la tirosina y la fenilalanina, se degradan de modo que una porción de su esqueleto carbonado se incorpora al ciclo de los ácidos tricarbóxicos como acetil-CoA y la otra como fumarato. Sin embargo, no todos los átomos de carbono de cada uno de los veinte aminoácidos se incorporan al ciclo de los ácidos tricarbóxicos, ya que algunos se pierden en la ruta mediante reacciones de descarboxilación.

Las rutas catabólicas de los aminoácidos son largas y complejas, con muchos intermediarios. Los diversos grupos amino terminan por ser incorporados al α -cetoglutaratato para formar glutamato, que es desaminado oxidativamente por la glutamato deshidrogenasa para dar NH_3 y α -cetoglutaratato. El catabolismo de aminoácidos tiene lugar, en gran parte, en el hígado, aunque el riñón también es significativamente activo.

Los átomos de nitrógeno de los grupos α -amino, separados de los aminoácidos durante su degradación oxidativa, son finalmente excretados por la orina de los vertebrados en forma de urea (organismos ureotélicos), de amoníaco (organismos amonotélicos) o de ácido úrico (organismos uricotélicos), según las

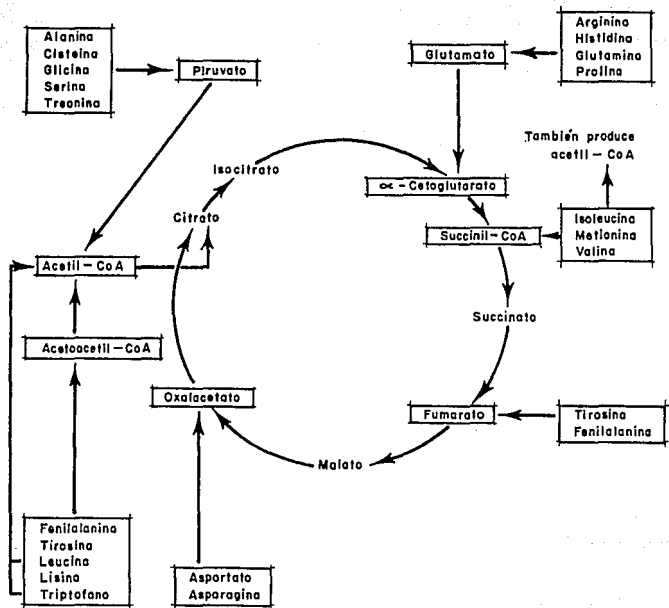


Fig. 1 Rutas de entrada de los aminoácidos en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. (51)

especies.

Ruta del α -Cetoglutarato.

Los esqueletos carbonados de cinco aminoácidos (arginina, histidina, glutamina, ácido glutámico y prolina) se incorporan al ciclo de los ácidos tricarboxílicos por la vía del α -cetoglutarato; todos ellos son glucogénicos (Fig.2).

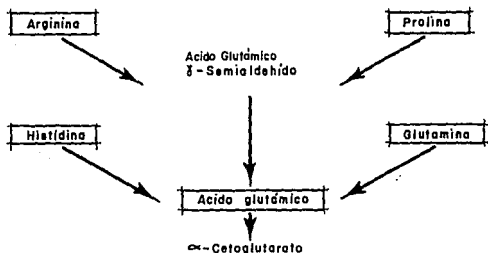


Fig. 2 Rutas que conducen al α -Cetoglutarato (51)

La ornitina se convierte después en semialdehído del ácido glutámico que es también un intermediario en la oxidación de prolina (Fig. 3).

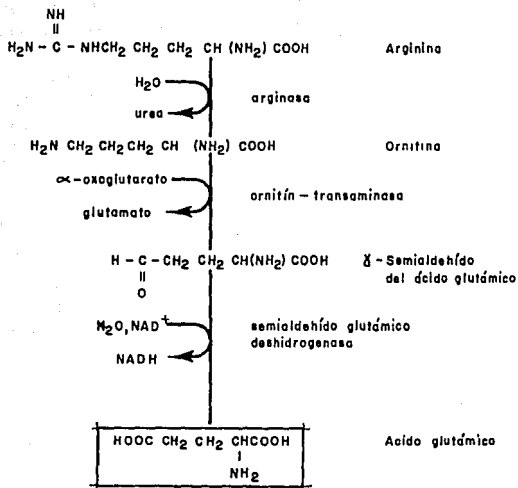


Fig. 3 Principales rutas para la conversión de arginina en ácido glutámico en los mamíferos. (51)

La ruta para la oxidación de histidina a ácido glutámico causa la apertura del anillo imidazólico para dar N-forminio-glutámico, del cual se separa el grupo forminio ($\text{NH}=\text{CH}-$), mediante una enzima que utiliza el tetrahidrofolato como aceptor de grupos monocarbonados (Fig.4).

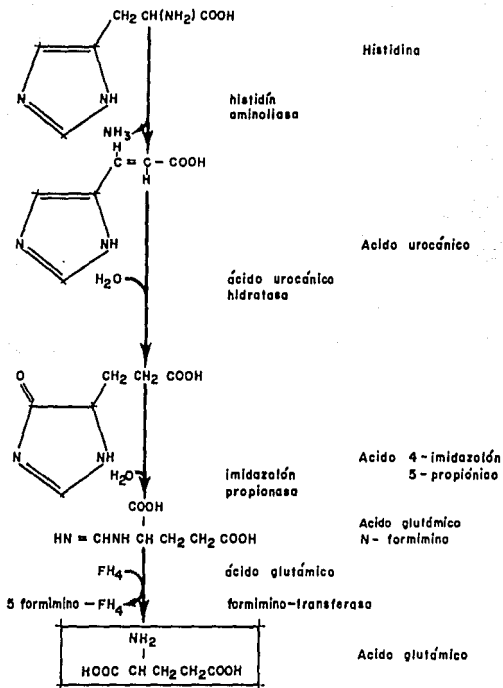
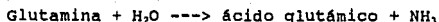


Fig. 4 Ruta principal de conversión de histidina en ácido glutámico, en los mamíferos. El tetrahidrofolato FH_4 actúa como aceptor del grupo formimino. (51)

La glutamina se hidroliza a ácido glutámico por acción de la enzima glutaminasa, particularmente en el riñón:



La glutamina se convierte también en ácido glutámico por la glutamatosintasa:



Mediante una tercera ruta la glutamina puede experimentar transaminación con el ácido α -cetoglutarico rindiendo ácido α -cetoglutarámico, que a su vez, se puede o bien hidrolizar formando α -cetoglutarato y amoníaco, o bien se cicliza para formar una lactama, la 2-hidroxi-5-cetoprolina.

La L-prolina después de su deshidrogenación, experimenta la apertura del anillo rindiendo el semialdehído del ácido L-glutámico (Fig.5).

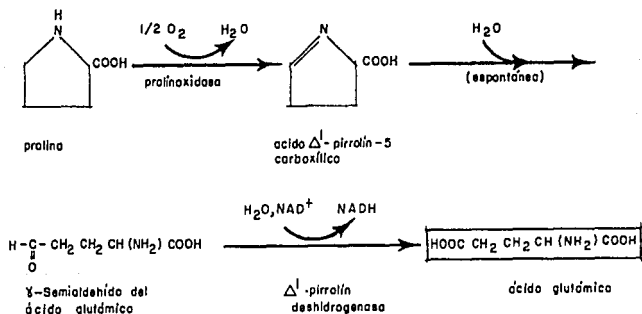


Fig.5 Catabolismo de la prolina y de la hidroxiprolina. Conversión de prolina en ácido glutámico. (51)

Ciclo de la urea.

La mayoría de los vertebrados e invertebrados excretan finalmente cierta fracción de amoníaco formado en una de estas tres formas: urea, amoníaco o ácido úrico.

La formación de urea, que tiene lugar en el hígado de los organismos ureotélicos, es catalizada por el mecanismo cíclico denominado ciclo de la urea. La ecuación global del ciclo de la urea es:

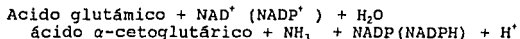


La formación de una molécula de urea necesita, por todo ello la hidrólisis de cuatro grupos fosfato de elevada energía aportados por el ATP.

A la secuencia del ciclo de la urea se incorporan dos grupos amino, originalmente derivados de los α -aminoácidos y una molécula de dióxido de carbono, mediante este proceso cíclico que necesita de ATP, se dá lugar a la formación de una molécula de urea, compuesto neutro y no tóxico que es transportado por la sangre a los riñones y se excreta por la orina.

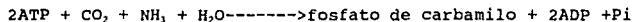
El ciclo de la urea consiste en cinco pasos regulados enzimáticamente (Fig.6):

- 1.- El primer grupo amino que entra en el ciclo de la urea surge en forma de amoníaco libre como consecuencia de la desaminación oxidativa del glutamato en las mitocondrias hepáticas:



El amoníaco libre es utilizado entonces junto con el dióxido

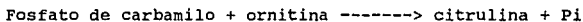
de carbono para formar fosfato de carbamilo, en una compleja reacción catalizada por la carbamil fosfato sintetasa (amoníaco), presente en la matriz mitocondrial:



Se necesitan dos moléculas de ATP para formar cada molécula de fosfato de carbamilo que interviene en esta reacción, la cual es esencialmente irreversible. Esta reacción, que se produce al menos en dos etapas, necesita de N-acetilglutamato, un activador alostérico.

La formación de fosfato de carbamilo en las mitocondrias, por esta ruta, está especializada en la síntesis de urea. Sin embargo, en el citosol de algunos tejidos, así como en las bacterias y en los hongos, el fosfato de carbamilo es sintetizado por una reacción diferente, catalizada por otra enzima, la carbamil fosfato sintetasa (glutamina).

2.- El fosfato de carbamilo producido en la mitocondria cede después su grupo carbamilo a la ornitina, que se forma en el citosol pero que penetra en la mitocondria a través de un sistema de transporte específico de la membrana interna. El producto es la citrulina:



Esta reacción es catalizada por la ornitina carbamil transferasa de la matriz mitocondrial. La citrulina formada abandona después la matriz mitocondrial, pasando al citosol, en el que tienen lugar las restantes reacciones del ciclo de la urea.

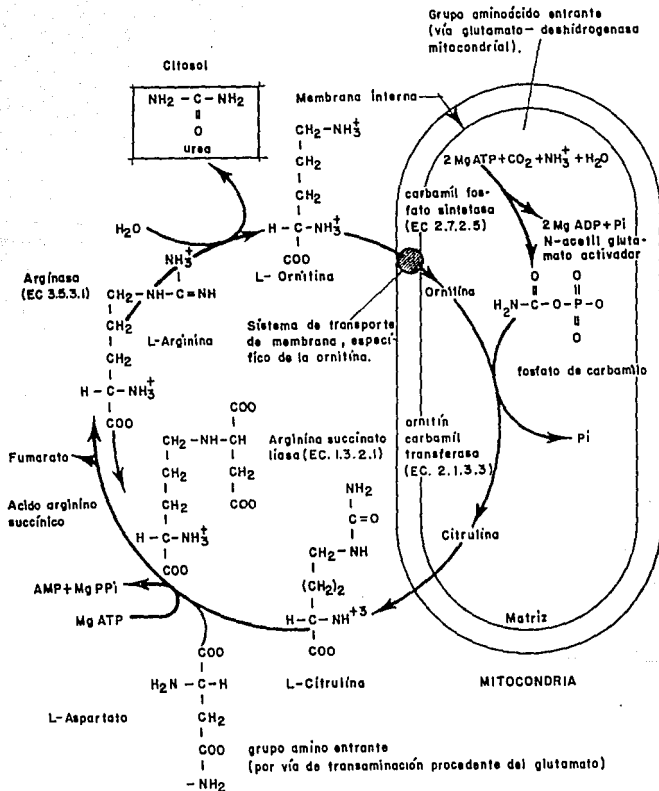


Fig. 6 Ciclo de la urea que muestra las etapas citoplásmica y mitocondrial. (51)

3.- El segundo grupo amino necesario para la síntesis de urea llega ahora en forma de aspartato que lo adquirió a su vez del glutamato por acción de la aspartato transaminasa en el citoplasma. El grupo amino del aspartato se condensa reversiblemente con el átomo de carbono carbamílico de la citrulina en presencia del ATP, para formar argininosuccinato; esta reacción es catalizada por la argininosuccinato sintetasa:

Citrulina + aspartato + ATP ---> argininosuccinato + AMP + PPI

El pirofosfato formado en ésta reacción queda hidrolizado por la pirofosfatasa a fosfato inorgánico, impulsando, de éste modo, la reacción global hacia la derecha.

4.- En la reacción siguiente, el argininosuccinato experimenta una reacción de eliminación en α , por acción de la argininosuccinato liasa para formar arginina libre y fumarato:

Argininosuccinato -----> arginina + fumarato

5.- La arginina formada en ésta reacción se transforma en el precursor inmediato de la urea, mientras que el fumarato retorna al conjunto de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Hasta este punto, la secuencia de reacción es la empleada por todos los organismos capaces de efectuar la biosíntesis de la arginina. Sin embargo, únicamente los animales ureotélicos poseen cantidades elevadas de arginasa, la cual separa la urea de la arginina, reacción que tiene lugar en el citosol:



La arginina se sintetiza de nuevo a partir de la ornitina, por carbamilación de esta última a citrulina, a expensas del fosfato de carbamilo y seguida de la adición de un grupo amino a la citrulina procedente del ácido aspártico.

Las enzimas que catalizan las reacciones suministradoras de grupos amino al ciclo de la urea, (aspartato transaminasa, glutamato deshidrogenasa, carbamil fosfato sintetasa y ornitina carbamil transferasa) se hayan localizadas en las mitocondrias de la célula hepática, proporcionando de este modo una compartimentación muy compleja de las reacciones del catabolismo de aminoácidos y de la síntesis de urea entre el citosol y las mitocondrias. Esta separación parece necesaria para impedir la acumulación de amoníaco libre en la sangre, el cual es sumamente tóxico para los vertebrados ureotélicos, particularmente para el sistema nervioso central.

Se han observado deficiencias genéticas de cada una de las diversas enzimas del ciclo de la urea en el ser humano.

-Interacciones entre el ciclo de la urea y otras vías metabólicas.

Biosíntesis de poliaminas.

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina están ampliamente distribuidas en los sistemas vivientes, aunque las

concentraciones relativas de estas aminas varían notablemente en células diferentes.

La función biológica de estas moléculas ha sido estudiada en microorganismos, en células animales y vegetales. En general, los procariontes tienen concentraciones más altas de putrescina que de espermidina y carecen de espermina mientras que los eucariontes tienen bajas concentraciones de putrescina y cantidades altas de espermidina y espermina.

Las poliaminas son de gran importancia ya que se ha demostrado que éstas son factores de crecimiento y que su presencia es esencial para la regulación de múltiples procesos, entre ellos la división, proliferación y diferenciación celulares. La Figura 7 muestra las fórmulas de las poliaminas.

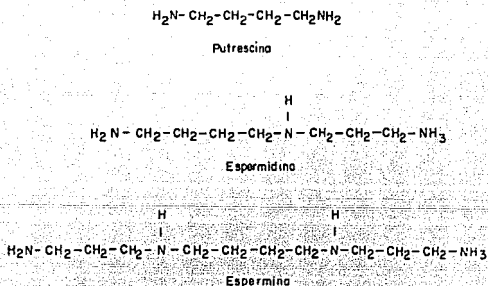


Fig. 7 Fórmulas de las poliaminas. (51)

En los mamíferos la biosíntesis de poliaminas se lleva a cabo a partir de ornitina, por lo tanto, la ruta que conduce a

la formación de putrescina es a través de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), (Fig.8).

La ornitina disponible para éstas reacciones proviene del plasma, además de que puede formarse dentro de las células por acción de la arginasa. Por esta razón se ha pensado que la arginasa puede ser una de las enzimas que regulan la etapa inicial en la biosíntesis de poliaminas, además de su participación fisiológica relacionada con el ciclo de la urea, donde ha sido tradicionalmente estudiada.

La inhibición específica de la biosíntesis de poliaminas puede ser un medio para el control de algunos estados patológicos. Por otra parte, la determinación de la concentración de estas aminas en orina y en otros fluidos corporales, constituye en algunos casos un indicador del estado de salud.

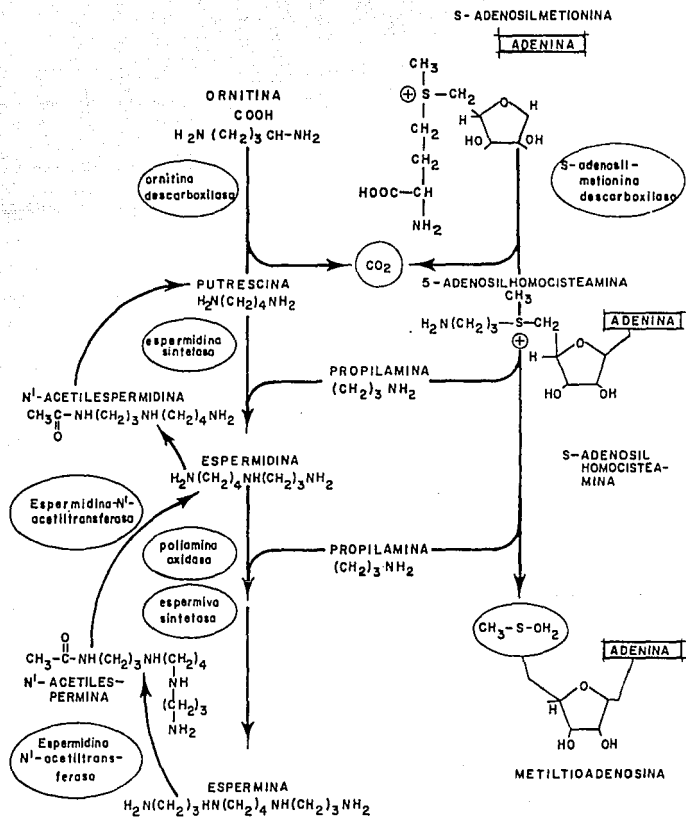


Fig. 8 Biosíntesis de poliaminas (51)

Ciclo del ácido cítrico.

Los componentes del ciclo de la urea en los vertebrados terrestres, como mamíferos y anfibios, están muy relacionados con el ciclo del ácido cítrico (Fig.9).

La síntesis de arginino succinato es un paso muy importante en la interacción del ciclo de la urea con el ciclo del ácido cítrico. La alanina es transaminada para formar piruvato y su grupo amino lo cede el α -cetoglutarato, pasando este a glutamato. El piruvato es descarboxilado para entrar al ciclo del ácido cítrico como un fragmento de dos carbonos.

El glutamato por una reacción de transaminación con el oxalacetato forma aspartato y se genera el alfa cetoglutarato. El aspartato así formado contiene el segundo grupo amino destinado para la síntesis de urea. El fumarato que se obtiene por hidrólisis de argininosuccinato, regresa al ciclo del ácido cítrico y la arginina queda disponible para la síntesis de proteínas en tejidos extrahepáticos o para proseguir con el ciclo de la urea.

Por otra parte, la arginasa efectúa la conversión de arginina en urea y ornitina y así el ciclo se completa. Cuando aumenta la síntesis de poliaminas se ha visto que aumenta la actividad de arginasa y que así se incrementa el suministro de ornitina hacia ornitina descarboxilasa.

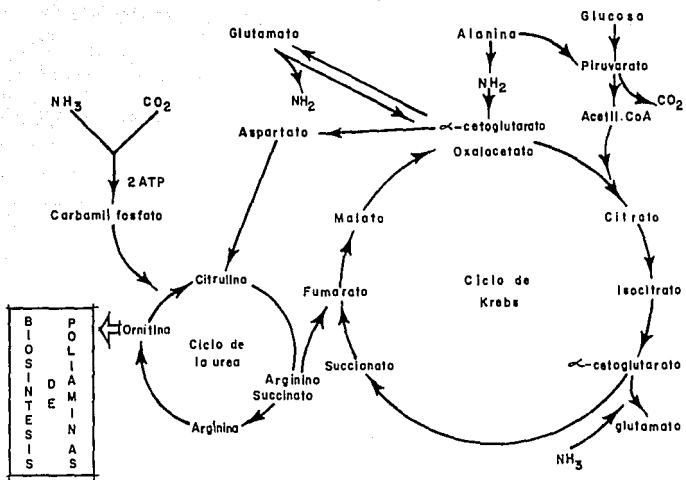


Fig. 9 . Ciclo del ácido cítrico y su interacción con otras vías metabólicas. (51)

Los componentes del ciclo de la urea funcionan como una unidad, como lo muestra el hecho de que las cinco enzimas del ciclo se incrementan en el hígado de ratas sometidas a una dieta alta de proteínas. En estos animales también se incrementan las enzimas relacionadas con el ciclo de la urea, como la alanino amino transferasa y aspartato amino transferasa. Todo esto comprueba que el ciclo de la urea funciona como una vía metabólica.

Los pasos limitantes de este ciclo son la formación de carbamil fosfato y la síntesis de argininosuccinato. A este respecto, se ha visto que la argininosuccinato sintetasa funciona al 60 % de su actividad por lo que en este paso debe haber limitación en la disponibilidad de sustrato, ya sea aspartato, citrulina o ATP.

A diferencia del hígado, varios tejidos extrahepáticos contienen solamente los últimos tres mecanismos enzimáticos del ciclo de la urea; en el cerebro y músculo, la biosíntesis de urea depende del aporte de citrulina que viene del hígado.

El desarrollo más dramático de la actividad de arginasa se presenta en el hígado, esto ocurre en 2 fases distintas; la prenatal, durante el último período fetal y la postnatal, durante la tercera semana.

La actividad de arginasa en la glándula mamaria aumenta a partir de cero en la glándula virgen, a actividades disnificativas durante la preñez y la lactancia.

Tabla 1. Distribución y comparación de la actividad de arginasa en diferentes tejidos de rata. (12)

Tejido	Actividad de arginasa (µmoles de urea/g de tejido)		
	Adulto	n	Fetal
Hígado	659 ± 37	(5)	85 ± 15 (4)
Intestino delgado	75 ± 8	(3)	
Riñón	42 ± 3	(5)	0
Páncreas	24 ± 3	(3)	
Pulmón	2.5 ± 1	(3)	0
Timo	0.9 ± 0.3	(5)	
Cerebro	0.8 ± 0.1	(5)	0
Músculo esquelético	0		
Bazo	0		
Adrenales	0		
Sangre	0		
Glándula mamaria:			
-Virgen	0		
-En la preñez (21 días de gestación)	29 ± 0.8	(3)	
-Lactante (10 días post-parto)	58 ± 64		
Tumores:			
-Hepatoma Dunning LC18	7.6 ± 1.1	(3)	
-Carcinoma mamario 205	5.3		
-Carcinoma Walker no diferenciado	4.1 ± 0.5	(3)	
-Carcinoma mamario DMBA 5A	4.1 ± 0.5	(3)	
-Carcinoma mamario DMBA 5B	3.8 ± 1.1	(3)	
-Carcinoma mamario 211	1.3 ± 1.2		

Los primeros 11 tejidos se obtuvieron de ratas macho de 90 días de edad; la edad gestacional de las ratas fetales fue 20-21 días. Los valores de adulto representan la media ± D.E. (desviación estándar) de los resultados con animales individuales cuyo número se presenta entre paréntesis; en donde se usaron menos de 3 animales, se dan valores individuales. El tejido de 4 a 6 fetos fue concentrado para el experimento. Los tejidos neoplásicos

Dunning LC18, 5A y 5B se obtuvieron de ratas Fischer. Peso de tejido corregido para el contenido de leche.

En varios neoplasmas de rata se han reportado repetidamente concentraciones de arginasa de menos del 10 % de la del hígado. En este estudio, se detectaron niveles más bajos de actividad de arginasa en varios tumores transplantados con respecto a los reportados con ensayos menos sensibles. Bajo las mismas condiciones se encontró actividad de arginasa baja o nula en varios tejidos normales y en todos los tejidos fetales exceptuando el hígado.

Los hepatomas bien diferenciados, de crecimiento lento, mantienen tanta actividad de arginasa como la normal en el hígado, mientras que los hepatomas no diferenciados, de crecimiento rápido, contienen mucho menos.

Herzfeld y Raper (10) mostraron la distribución de arginasa en 16 tejidos diferentes de rata adulto normal (ratas Kx de 90 días de edad o ratas Kx fetales) (Tabla 2). A partir de esta distribución, otro tejido (el duodeno) se cuenta entre los órganos que presentan actividades relativamente altas de arginasa, mientras que las actividades en piel, adrenales y timo fueron las más bajas. Más de la mitad de los tejidos muestreados tuvieron actividades de arginasa muy bajas (0.4-7.9 unidades/g). La piel de rata presentó menos de 0.1 % de la actividad del hígado (Tabla 2).

Harri et al (31), compararon la actividad de arginasa en la mucosa del intestino delgado con la actividad en el hígado de ratas (Wistar) hembras y machos. La Tabla 3 muestra las actividades de arginasa en la mucosa del intestino delgado, hígado y

Tabla 2. Distribución de arginasa en tejidos de ratá adulta. (10)

Tejidos normales	No. de animales usados	Actividad de arginasa (unidades/g de tejido)
Hígado	(32)	2.45 ± 1.6
Glándula submaxilar	(12)	1.70 ± 1.5
Intestino delgado	(18)	1.23 ± 2.1
Epláidimo	(3)	1.25 ± 1.1
Páncreas	(13)	1.53 ± 3
Duodeno (5 cm posteriores al estómago)	(4)	3 ± 2.0
Riñón	(18)	56.5 ± 7
Colon (primeros 7 cm después del ciego)	(4)	7.3 ± 5.7
Pulmón	(4)	5.4 ± 1.9
Cerebro	(13)	2.5 ± 0.5
Piel	(2)	2.0 ± 1.6
Timo	(1)	1.9
Bazo	(4)	1.1 ± 0.2
Adrenales	(1)	2.7
Corazón	(3)	0.6 ± 3.03
Músculo esquelético	(3)	0.4 ± 0.3

La enzima en todos los tejidos fué activada previamente en amortiguador de Mn^{2+} /imidazol a 50°C por 10 min. Una unidad de arginasa representa la formación de 1 μmol de urea/min a 37°C. Los números en los paréntesis indican la cantidad de animales usados. Cada valor representa la media \pm D.E. (desviación estándar).

parte glandular del estómago.

La actividad de arginasa de varias partes del intestino delgado es casi del 5 a 10 % de la actividad en el hígado por 1 g de peso de tejido húmedo.

Cuando los dos sexos se comparan, la actividad de arginasa en el hígado de los machos es significativamente más alta que en las hembras en la cepa utilizada (Wistar). Al comparar la mucosa de varias partes del intestino delgado se observa que la mucosa

Tabla 3. Actividades de arginasa en la mucosa del intestino delgado (duodeno, yeyuno e ileón) comparadas con las actividades del hígado y de la parte glandular del estómago. (12)

Tejido u órgano	Actividad de arginasa (µmoles de urea formada /min/g de proteína)	E.S. (error estándar)
a) Hembras (7):		
Hígado	158.0	3.3
Mucosa yeyunal	9.4	1.3
Mucosa ileal	13.2	1.5
Mucosa glandular ven- tricular	7.8	1.2
b) Machos (12):		
Hígado	199.3	12.2
Mucosa duodenal	13.5	1.5
Mucosa yeyunal	18.0	2.1
Mucosa ileal	11.6	1.3
Mucosa glandular ven- tricular	0.5	3.1

yeyunal es el sitio de mayor actividad de arginasa. La actividad en la mucosa duodenal de ratas macho es significativa ($2P < 0.05$) y en la mucosa ileal de los machos es significativamente mayor que en la de las hembras. Esto demuestra algunas diferencias del sexo en cuanto a la retención intestinal de arginina en la rata.

-Localización intracelular.

En general, a las enzimas del ciclo de la urea se les ha asignado la siguiente distribución dentro de la célula (51). Las enzimas carbamil fosfato sintetasa y ornitina trascarbamilasa se encuentran localizadas en la fracción mitocondrial del hí-

gado, mientras que arginino succinato sintetasa, arginino succinato liasa (estas dos ultimas formando el sistema arginina sintetasa) y arginasa se localizan en la fracción de proteína soluble (56), es decir en el citosol del hígado y de otros tejidos extrahepáticos (57).

Por otra parte, existen estudios adicionales que reportan la presencia de actividad de arginasa en otras regiones intracelulares:

Mora et al (122), estudiaron la distribución intracelular de todas las enzimas del ciclo de la urea en hígados de rata. Estos autores también investigaron si las diferencias en la eficiencia de producción de urea en el sistema arginina-sintetasa pueden ser explicadas por la diferente localización de las enzimas participantes.

De acuerdo con este estudio, se observó que las enzimas carbamil fosfato sintetasa y ornitina transcarbamilasa estuvieron principalmente localizadas en la mitocondria y el núcleo, y una gran cantidad de arginasa estuvo ligada a la fracción microsomal además del núcleo y de la mitocondria (Tabla 4).

El valor de Km de la arginasa microsomal (200 mM) fué mayor que el observado para el homogeneizado total de hígado de rata en agua. La enzima microsomal fué liberada utilizando solución de cloruro de potasio (Fig. 10).

Las partículas microsomales fueron divididas en dos partes: una fué resuspendida en manitol 0.4 M y la otra en cloruro

Tabla 4. Centrifugación diferencial de los homogeneizados de hígado de rata. (122)

Distribución de la actividad (% del total)				
Carbamil fosfato sintetasa	Cristina transcarbamilasa	Sistema arginina sintetasa	Arginasa	Fracción (%)
Núcleo	34	41	0	40
Mitochondria	66	53	0	19
Microsomas	0	2	0	17
Sobrenadante	0	4	100	4

de potasio 77 mM y manitol 0.4 M. Para la segunda parte, la suspensión fué centrifugada de nuevo a 114,000 x g durante 70 min.

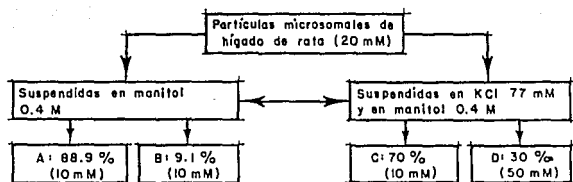


Fig. 10 Liberación de la arginasa microsomal por KCl. Los precipitados (A y D) se resuspendieron en solución de KCl libre de mg nitro. Los números en los paréntesis indican los valores de Km, y los porcentajes se refieren a la distribución de la actividad enzimática. (58).

Las enzimas liberadas (B) y (C) tienen valores de Km de aproximadamente 10 mM, este valor es menor que el originalmente encontrado en el homogeneizado total del hígado. El mismo valor

se obtuvo cuando la enzima microsomal se ensayó con cloruro de potasio sin remover las partículas (A), lo cual sugiere que la enzima unida es liberada. El alto valor de Km observado para la fracción (D) probablemente es debido al hecho de que alguna actividad de arginasa permanece ligada a los microsomas.

Cuando la arginasa del homogeneizado total de hígado de rata es inhibida por isoleucina, la formación de urea decrece y la arginina se acumula. Esto puede ser debido no solo a la inhibición de la enzima, sino también a la liberación de la misma a partir de las diferentes partículas.

Los autores explican que la presencia de arginasa ligada a diferentes partículas es debida a la consecuencia de que la enzima es una proteína básica la cual puede estar realmente ligada a partículas que contienen ácidos nucleicos.

Los resultados dados por centrifugación diferencial representan una situación real en la célula. Así, la fracción de actividad de arginasa localizada en los microsomas, está relacionada con la excreción de urea.

El trabajo posterior realizado por Cheung et al (67), confirma la presencia de arginasa en las mitocondrias de células de hígado de rata. Este organelo aislado en solución de amortiguador de manitol, contiene cantidades significativas de actividad de arginasa. La mayor parte de la actividad (90%) es liberada de la mitocondria suspendida en KCl 150 mM; aproximadamente 10 % de la actividad de arginasa permanece unida después de dos lavados con KCl 150 mM.

La arginasa de la mitocondria lavada con solución de KCl esta asociada con la membrana externa y no se solubiliza por rompimiento de la mitocondria con digitonina; fracciones pequeñas de esta arginasa son solubilizadas al lavar los fragmentos de la membrana exterior con KCl 150 mM.

Los valores de K_m obtenidos para la arginasa mitocondrial no lavada y lavada con KCl 150 mM a pH 7.4, son 2.4 y 1.6, respectivamente. A pH 9.5, el valor de K_m para la arginasa mitocondrial no lavada es de 3.6 mM y para la misma enzima lavada con KCl es de 1mM. Estos valores de K_m están en el rango de los valores de K_m reportados por Tarrab et al (65) para la arginasa microsomal del hígado. Al igual que la enzima microsomal, la arginasa mitocondrial es más activa a pH 9.5 que a pH 7.4.

Utilizando preparaciones frescas, la actividad de la arginasa mitocondrial no aumenta al ser preincubada con $MnCl_2$ 50 mM a pH 7.4. Con arginina 2 mM, la velocidad de generación de ornitina a través de la arginasa mitocondrial, es suficiente para mantener altas velocidades de síntesis de citrulina a partir de HCO_3 y amoníaco.

Kaysen et al (35) y otros investigadores (56,89), han demostrado que la arginasa de hígado de rata es solubilizada por extracción con soluciones iónicas cercanas a las concentraciones fisiológicas, mientras que la enzima de riñón de rata se encuentra firmemente unida a la mitocondria y esta requiere de fragmentación para liberar a la arginasa en solución (35).

La arginasa mitocondrial de hígado crudo parece diferir de la enzima microsomal en que la anterior no es activada con $MnCl_2$; en todas las demás propiedades estudiadas, ambas enzimas mitocondrial y microsomal se asemejan (58). Los datos que se han obtenido son insuficientes para establecer la identidad y no identidad de estas arginasas; sin embargo, las características de solubilidad remarcadamente diferentes de la arginasa lavada con KCl que permanece unida a la mitocondria, indican que ésta puede ser una isoenzima diferente a la microsomal (22).

Se ha sugerido que la arginasa mitocondrial forma ornitina a través de arginina, en la membrana externa de la misma (22). Esto puede ser funcionalmente ventajoso para la síntesis de urea pues la enzima puede contribuir a el transporte de ornitina hacia la mitocondria. Sin embargo, la actividad de arginasa en el hígado es muy alta (10) y la mayor parte de esta es probable que no este asociada a la mitocondria "in vivo".

En el intestino delgado (12), se ha observado que la actividad de arginasa esta ligada a la fracción mitocondrial.

Terayama et al (40), demostraron que las membranas plasmáticas de células de hígado contienen actividad de arginasa. Los autores sugirieron que esta enzima es distinta a la que se encuentra en el citosol del hígado (61).

La función fisiológica de la enzima unida a las membranas plasmáticas de células de hígado (Tabla 5) aún no ha sido aclarada pero se cree que esta pueda estar relacionada de alguna manera con los mecanismos que controlan el crecimiento de las

células de hígado (40).

Tabla 3. Localización intracelular de arginasa a partir de diferentes fuentes. (40)

Fuente de arginasa	Localización intracelular	Referencias
Hígado:	Microsomos	(58)
	Citosol	(35, 51)
	Núcleo	(58)
	Mitocondria	(58, 59)
	Membrana plasmática	(63)
Riñón:	Mitocondria	(35)
	Membrana	(61)
Glándula mamaria:	Membrana celular	(36)
Intestino delgado:	Mitocondria	(51)
Próstata ventral:	Membrana	(61)

Solubilización con 1-butanol: solubilización con Triton X-100.

Arginasa hepática.

Las arginasas de hígado de diferentes fuentes dependen de la temperatura y de los iones Mn^{+2} para la activación completa "in vitro" (43). Después de este tratamiento en el homogeneizado de hígado de rata, la enzima es completamente soluble (60).

La arginasa de hígado de rata es comparativamente estable pues no se disocia fácilmente (53,58). Sin embargo, la enzima es disociada en monómeros inactivos por tratamiento ácido (55,61) o

por tratamiento con el agente acomplejante EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) (201). La arginasa de hígado de mamífero está constituida por cuatro subunidades con pesos moleculares de aproximadamente 30,000 Daltones.

Las preparaciones de arginasa de hígado de rata obtenidas a partir de diversos procesos de purificación, son homogéneas (60) Estas preparaciones son también homogéneas cuando se sujetan a la técnica de sedimentación en un gradiente de 5 a 20 % de sacarosa, obteniéndose un valor de $S \times w = 5.56 S$.

En electroforesis, la migración de la arginasa de hígado de rata hacia el cátodo a pH 8.6, es indicativa del carácter básico de la enzima; lo mismo se deduce a partir de la evidencia de su fuerte adsorción en carboximetil-celulosa (60).

El patrón de doble difusión Ouchterlony de antisuero realizado contra la preparación homogénea de arginasa, muestra una sola banda de precipitación, lo cual indica que este antisuero contiene un anticuerpo simple y específico que reacciona contra la proteína antigénica que es la arginasa homogénea en los extractos de hígado de rata (60); la actividad de la enzima puede ser recuperada en el precipitado antígeno-anticuerpo bajo condiciones estandar del ensayo. Las arginasas presentes en otros tejidos de rata también son precipitadas por el antisuero pero no se puede demostrar fácilmente la reacción-cruzada.

Con respecto al efecto de los cationes divalentes, se ha encontrado que una variedad de iones metálicos activan y/o estabilizan a las arginasa de diferentes tejidos (58). Se ha demos-

trado que se puede reactivar a la arginasa de hígado de ternera después de ser tratada con agentes oxidantes (como sulfuro de hidrógeno) por adición de los iones metálicos Mn^{+2} , Co^{+1} , Ni^{+3} e inclusive Fe^{+3} . Los iones Cu^{+1} , Hg^{+2} y Ag^{+1} destruyen la actividad de la enzima, en parte por precipitación de esta. La acción del HCN es depresiva (58).

Se ha mostrado que la enzima de hígado de rata es también activada por iones Mn^{+2} , Ca^{+1} , Ni^{+3} ó Co^{+1} en las preparaciones "in vitro" y se ha sugerido que el Mn^{+2} es el catión activante "in vivo", sin excluir completamente la posibilidad de la participación de Fe^{+3} (o hasta Co^{+1} ó Ni^{+3}) (60). Los ensayos de la actividad de arginasa de hígado de rata o ratón deficientes en Mn^{+2} mostraron retraso en el crecimiento y fallas en la reproducción. Sin embargo, no se observó efecto en la excreción de urea, hasta después de administrar grandes dosis de citrato de amonio. La disminución observada en la actividad de arginasa de hígado causada por deficiencia de Mn^{+2} , se acepta generalmente como prueba adicional de que el ión Mn^{+2} está involucrado en las reacciones de arginasa de hígado "in vivo" (60).

Los iones manganeso protegen a la arginasa de hígado de rata de la disociación con dodecil sulfato de sodio (DSS), lo cual sugiere que estos iones están directamente involucrados en la creación de la forma tetramérica de la enzima (54).

Los estudios de resonancia magnética nuclear del enlace del Mn^{+2} a la arginasa de hígado de rata, muestran que la enzima con una actividad catalítica residual de 50 %, no se disocia en sub-

unidades y contiene dos moles de manganeso por mol de arginasa (59). Esto sugiere que la enzima existe en la forma $E-Mn^{+2}$. El resultado de la activación por manganeso de la forma $E-Mn^{+2}$ a la forma $E-Mn^{+2}$ es la restauración del 100 % de la actividad (59).

Un estudio comparativo muestra que la K_m a pH 9.5 de la arginasa de hígado (activada con Mn^{+2}) presente en varios animales ureotélicos es de 10 a 40 mM, mientras que la K_m para las arginasas de animales uricotélicos es de 100 a 200 mM (122). Los valores de K_m reportados por diferentes investigadores para las arginasas de hígado de diferentes especies de mamíferos, varían de 2 mM a 40 mM (62).

Inhibición.

Hunter et al (63), reportaron que la arginasa de hígado de bovino muestra una actividad reducida en presencia de hidrolizados de proteína y que esta actividad disminuida es debida a la interacción de diferentes aminoácidos con arginasa, lo que conduce a la inhibición de la enzima. Estas combinaciones probablemente causan cambios conformacionales, los cuales deterioran el recambio del complejo enzima-sustrato. Este estudio mostró que los inhibidores competitivos de arginasa de hígado de bovino fueron ornitina y lisina y los inhibidores no competitivos fueron los aminoácidos isoleucina, valina y cisteína.

Los estudios detallados de las cinéticas de inhibición de arginasa por diferentes aminoácidos, pueden ayudar a explicar el aumento en la actividad de la arginasa hepática reportado en los vertebrados bajo la influencia de ciertos factores como la dieta

alta en proteína (64) , inanición (56), hormonas glucocorticoides (57), etc. Se sabe que estos factores también realzan los niveles de aminoácidos libres, estimulando el catabolismo de proteínas (65).

Kesevarao et al (199), estudiaron el efecto de 18 L-aminoácidos diferentes en la actividad de arginasa de hígado de oveja (Tabla 6).

Los aminoácidos alanina e histidina mostraron una estimulación ligera en la actividad enzimática, y ornitina, lisina, isoleucina, valina y prolina inhibieron a la enzima (33-81 %). Otros aminoácidos como treonina y glutamato no tuvieron ningún efecto significativo (Tabla 6).

La inhibición de la enzima parece ser una propiedad que depende de la longitud de la cadena de carbonos en los aminoácidos. Los aminoácidos ornitina, lisina y prolina mostraron ser inhibidores competitivos, afectando solo la K_m , mientras que L-valina mostró un tipo de inhibición mezclada, afectando la K_m y V_{max} de la enzima inactiva en las gráficas de doble recíproco de Lineweaver-Burk.

La leucina inhibió competitivamente a la enzima inactivada pero mostró inhibición de tipo mezclado por pretratamiento con Mn^{+2} y la isoleucina inhibió competitivamente a la enzima inactivada a altas concentraciones de sustrato, y no competitivamente, a bajas concentraciones del mismo, sugiriendo efectos heterotrópicos de cooperatividad negativa. Estos efectos de cooperatividad negativa de la isoleucina, fueron reversibles cuando la en-

zima se activo con Mn^{2+} . Las constantes de Michaelis determinadas para la arginasa de hígado de oveja variaron desde 9 mM a 28 mM. Esta variabilidad en la Km es debida probablemente a que se utilizaron extractos crudos de diferentes especies animales.

Tabla 5. Efecto de los L-aminoácidos en la actividad de arginasa de hígado de oveja. (199)

Experimento	Aminoácido (50M)	Actividad de arginasa * (μ m de urea/h/mg de proteína)	Porcentaje de cambio
I	Ninguno	147.3	+10.5
	Alanina	162.3	+ 6.2
	Serina	132.4	- 3.0
	Treonina	142.3	- 4.7
	Aspartato	140.4	- 7.9
	Glutamato	135.7	- 3.1
	Cisteína	135.3	- 8.2
	Metionina	140.6	- 4.6
	Valina	32.7	-77.8
	Leucina	55.5	-63.6
	Lisina	46.2	-68.6
	Ornitina	27.6	-81.3
	Tirosina	155.7	+ 5.7
	Fenilalanina	138.4	- 6.0
	Triptofano	138.4	- 6.0
	Histidina	175.1	+18.9
	Prolina	98.4	-33.3
II	Ninguno	128.9	
	Isoleucina	43.6	-95.2

* Enzima inactivada

• Denota activación y - denota inhibición de la actividad de arginasa.

Los valores de K_i para los seis aminoácidos inhibidores de arginasa de hígado de oveja son: lisina, 2.2 mM; ornitina, 4.4 mM; leucina e isoleucina, 2.9 mM; valina, 5.3 mM y prolina, 10 mM.

Además de prolina, solo los aminoácidos acíclicos monocarboxílicos con 5 o más átomos de carbono (leucina, valina, lisina y ornitina) inhibieron a la arginasa de hígado de oveja. La arginina que es el sustrato de la enzima, contiene 6 átomos de carbono. Probablemente la longitud de la cadena carbonada es crítica en el aminoácido inhibidor para competir efectivamente con el (o los) sitio(s) activo(s). El glutamato y metionina que contienen solo 5 átomos de carbono cada uno, no inhiben a la enzima. La presencia de un segundo grupo carboxilo en el glutamato y un átomo de azufre en la metionina, quizá disminuya su eficacia en la competencia por el sustrato.

Hunter et al (63), reportaron inhibición de la arginasa de hígado de bovino por ornitina, leucina, isoleucina, valina, prolina y fenilalanina, además de algunos aminoácidos no comunes como norvalina, norleucina y ácido α -aminobutírico. Se ha reportado que la ornitina es un inhibidor de tipo no competitivo para la arginasa de hígado de rata pero que esta inhibe a la arginasa de especies uricotélicas competitivamente (58).

Es tentativo especular que la inhibición de arginasa por prolina pueda tener una importancia regulatoria involucrando un mecanismo de retroalimentación.

Los resultados de este estudio sugieren que la activación de la arginasa con cationes divalentes altera las cinéticas de inhibición de la enzima por aminoácidos.

Otra investigación realizada por Reddy et al (35), muestra el efecto de 16 L-aminoácidos en los niveles de actividad de ar-

ginasa en homogeneizado de cerebro de oveja (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de L-aminoácidos en la actividad de arginasa en homogeneizados de cerebro de oveja. (35)

Aminoácido (2.5 μ mol)	Actividad de arginasa (μ mol de urea/h/mg de proteína)	Porcentaje de cambio	Significancia
Ninguno	12.40 \pm 0.38	---	---
Glicina	12.25 \pm 0.25	-5	N.S.
Alanina	13.45 \pm 0.41	+8	N.S.
Acido aspártico	16.50 \pm 0.23	+30	P < 0.05
Acido glutámico	10.00 \pm 0.26	-20	N.S.
Cistina	11.10 \pm 0.28	-12	N.S.
Leucina	5.65 \pm 0.25	-55	P < 0.01
Prolina	9.95 \pm 0.31	-20	N.S.
Metionina	11.05 \pm 0.38	-9	N.S.
Ornitina	7.25 \pm 0.22	-42	P < 0.01
Fenilalanina	13.30 \pm 0.38	+7	N.S.
Valina	6.25 \pm 0.31	-49	P < 0.01
Histidina	15.10 \pm 0.26	+22	P < 0.05
Serina	13.10 \pm 0.26	+5	N.S.
Triptofano	12.20 \pm 0.31	-3	N.S.
Tirosina	12.90 \pm 0.34	+4	N.S.
Lisina	7.00 \pm 0.21	-43	P < 0.01

Cada valor representa el promedio a partir de seis cerebros de oveja \pm D.E. (desviación estandar). El tejido cerebral fué lavado en solución amortiguadora de Tris pH 9.0.
N.S., No significativo.

Este estudio demostró que los aminoácidos leucina, valina, lisina y ornitina inhibieron la actividad de arginasa significativamente. Los otros aminoácidos muestreados no tuvieron una influencia significativa sobre la actividad de arginasa.

La inhibición de la arginasa también estuvo relacionada con la longitud de la cadena de carbonos en los aminoácidos. La inhibición ocasionada por prolina no fué muy significativa. Esto puede ser debido a la posibilidad de que la arginasa este involucrada en la síntesis de prolina en el cerebro (35).

El reporte de Madsen et al (175), muestra la inhibición "in vitro" de la actividad de arginasa en el homogeneizado de hígado de rata por el aminoácido hepatotóxico indospicina (ácido hexa-noico, L-2-amino-6-amidino), (Tabla 8).

La administración aguda de este aminoácido deprime la incorporación de ^{14}C -leucina en el hígado y en la proteína sérica "in vivo", pues se ha demostrado que existe un antagonismo competitivo entre indospicina y arginina que hace que la indospicina limite la incorporación de ^{14}C -leucina en la proteína.

Se observó que la actividad de arginasa es inhibida por indospicina de ambas fuentes (nativa y sintética) y que el grado de inhibición depende de la concentración de indospicina presente. Se requiere 2 veces la concentración de la forma DL de la toxina para producir el mismo grado de inhibición de la forma L. Una inhibición similar por indospicina ocurrió en la incorporación "in vitro" de ^{14}C -arginina; sólo la forma L fué activa como inhibidor.

Tabla 8. Efecto de la L-indsopicina natural o DL-indsopicina sintética en la actividad de arginasa de homogenizado de hígado de rata. (173)

Presencia de indsopicina (mM)	Actividad de arginasa	Porcentaje del valor control
Ninguna	2.60	
L-indsopicina:		
3.125	1.38	52
6.125	1.00	38
15.625	0.56	22
31.25	0.34	13
DL-indsopicina:		
6.25	1.22	47
12.50	0.88	34

La actividad enzimática es expresada como n-moles de urea formada por g de hígado húmedo a 38°C durante diez minutos.

La gráfica de Lineweaver-Burk mostró que la indsopicina es un inhibidor competitivo y los valores de K_m y K_i obtenidos fueron de 1.14 mM y 1.49 mM, respectivamente.

En adición a los miembros del ciclo de la urea, otros inhibidores de arginasa de estructura conocida incluyen: ácido clorogénico y sus derivados, colorantes de trifenil metano, ácido fosfónico y sulfonil urea. Algunas investigaciones de interés particular son las que reportan inhibidores competitivos y no competitivos de la arginasa, de bajos pesos moleculares y solubles, estables a 100°C. Estos inhibidores no se purificaron suficientemente como para permitir su identificación, pero sus propiedades, en adición a su amplia distribución (en flores de sol y en tejidos de animales vertebrados e invertebrados), sugieren que éstos son purinas y pirimidinas (69). Así, los

productos del metabolismo de los ácidos nucleicos pueden influenciar el ciclo de la urea "in vivo". Algunos otros inhibidores de arginasa de estructura conocida (175), aparentemente se asemejan a la arginina en poseer un grupo guanidino.

Rosenfeld et al (39), han reportado que varias purinas son inhibidores competitivos de la arginasa de hígado de bovino, y que las pirimidinas son inhibidores no competitivos (Tabla 9).

Tabla 9. Inhibidores (purinas y pirimidinas) de la arginasa de hígado de bovino. (39)

Inhibidor (0.03 mM)	Ki (μ moles)	
Adenosina	30	Competitivos
Inosina	40	
Adenina	14	
Acido úrico	9	
Citidina	5	No competitivos
Citosina	3.3	

La afinidad de la enzima por estos inhibidores fué 10 a 100 veces más grande que para el sustrato en términos de K_i vs K_m . De las purinas, el inhibidor competitivo más potente fué el ácido úrico. Si se considera que la K_m para esta enzima se aproxima a la K_s , la K_i puede ser comparada con la K_m para evaluar las afinidades de los inhibidores competitivos relativos al sustrato. Esto sugiere que los compuestos listados en la tabla 9 están unidos por la enzima de 10 a 15 veces más fuerte que el sustrato. La inosina es la que presenta una unión más débil para

la L-arginina; el valor de K_m encontrado fué de 300 a 400 μM .

Las pirimidinas presentaron una afinidad mayor por la enzima que las purinas, pero estas fueron inhibidores no competitivos. La citosina tuvo una afinidad mayor que el ribosido.

En conclusión, los resultados de este estudio sugirieron que los nucleótidos pueden influenciar el ciclo de la urea "in vivo".

Una investigación posterior demostró que la L-ornitina ($K_i = 1.3$ mM, pH 9.5) y adenina ($K_i = 0.7$ mM, pH 9.5) fueron inhibidores competitivos de la arginasa de hígado de vaca, y el borato ($K_i = 0.25$ mM) fué un inhibidor no competitivo de la enzima (166). En contraste con Rosenfeld et al (39), en esta investigación no se observó inhibición de la arginasa por citidina, citosina o adenosina. La adenina fué un inhibidor considerablemente menos efectivo como estos autores reportaron, pero la K_i encontrada fué de aproximadamente 700 μM en contraste con la K_i de 14 μM reportada anteriormente (39).

Al usar una concentración de 100 μM y hasta de 300 μM de citidina, citosina o adenosina, se observó una inhibición insignificante de arginasa. Los métodos de determinación de las velocidades en las gráficas de Lineweaver-Burk difieren. Pace (166) determinó las velocidades midiendo la formación de urea y usando muestras pares de enzima y Rosenfeld et al (39) utilizaron un método directo de ensayo espectrofotométrico basado en la medida de los cambios de absorción a 206 nm. Consecuentemente, estos autores utilizaron una concentración de sustrato (0.5-1.0 mM

de L-arginina) y de inhibidores (0.05 mM) muy limitadas. El desacuerdo con los resultados presentados por Pace (166) probablemente resulta a partir de éstas limitaciones.

Inactivación proteolítica.

En 1971, Bond (150), comparó la susceptibilidad proteolítica de cinco enzimas al ataque proteolítico en extractos de hígado de rata. Las enzimas con tiempos de vida media cortos "in vivo" son especialmente vulnerables al ataque proteolítico (medidos como la pérdida de la actividad "in vitro"), en contraste con las enzimas de tiempos de vida media más largos que son más resistentes.

Tabla 10. Comparación de los tiempos de vida media de cinco diferentes enzimas. (152)

Enzima	Tiempo de Vida Media
Arginasa	4-5 días (57)
Lactato deshidrogenasa	3.5-10 días
Catalasa	1.1-2.2 días
Serina deshidratasa	3-20 horas
Tirosina aminotransferasa	1.5-11.7 horas

Rango de los tiempos de vida media "in vivo" reportadas en la literatura. Se considera que las cinco enzimas son "solubles" en la célula a excepción de catalasa.

Existe una buena correlación entre las velocidades relativas de inactivación "in vivo" e "in vitro" sólo con las proteasas específicas como tripsina y quimiotripsina pero no con las

proteasas no específicas como pronasa. Esto sugiere que las enzimas proteolíticas con algún grado de especificidad, están involucradas en la degradación de enzimas intracelulares.

Aunque las enzimas tripsina y quimiotripsina no están presentes en las células del hígado, las proteasas con especificidades similares si pueden estar presentes.

Debido a que la susceptibilidad proteolítica de las enzimas solubles parece ser una determinante de sus vidas medias "in vivo", los factores que alteran esta propiedad pueden ser fisiológicamente importantes.

En un estudio posterior, Bond (150) demostró que el ión Mn^{2+} aumenta la susceptibilidad proteolítica de la arginasa de hígado de vaca y que ciertos aminoácidos (isoleucina, leucina, arginina, valina, alanina y cisteína) protegen a la enzima activada con Mn^{2+} o con Co^{+1} de la susceptibilidad por inactivación proteolítica. Esto indica que los activadores inducen un cambio conformacional, aunque esto no involucre la disociación de la enzima en subunidades.

El ión Mg^{+1} que no activa a la arginasa de hígado de vaca, tampoco afecta su susceptibilidad proteolítica. El uso de concentraciones elevadas de Mn^{2+} (1-50 mM), ocasionó un aumento en la activación así como en la susceptibilidad triptica.

Las enzimas tripsina y quimiotripsina fueron más efectivas a comparación de pronasa y subtilisina para la inactivación de arginasa tratada con Mn^{2+} .

De todos los aminoácidos que protegieron las preparaciones

de arginasa de hígado de vaca contra la inactivación triptica, la protección más efectiva fué proporcionada por cisteína, isoleucina, valina y alanina. La isoleucina protegió a una concentración tan baja como 0.38 mM. Este valor esta en el rango de concentración fisiológica para los aminoácidos del citoplasma e indica que estos pueden interactuar con la arginasa de hígado "in vivo".

El descubrimiento de que el ión Mn^{+2} aumenta la susceptibilidad proteolítica de la arginasa de hígado de vaca es inesperado pues se ha reportado que este catión protege a la arginasa de hígado de rata contra la inactivación por tripsina y enzimas lisosomales (42).

Las diferencias obtenidas en la experimentación pueden ser debidas al uso de especies distintas ya que la arginasa difiere substancialmente en propiedades entre una especie y otra (44, 49, 53). A partir de la evidencia existente en las diferencias de propiedades entre las distintas arginasas, es importante tener precaución al extrapolar los datos de una especie a otra.

Bond (150) encontró que solo los aminoácidos que inhiben no competitivamente a la arginasa de hígado de vaca, protegen a esta enzima contra tripsina. Esto está en acuerdo con el mecanismo de inhibición no competitiva en el cual el inhibidor se combina reversiblemente con la enzima en un punto diferente en el cual se combina con el sustrato. Los ligandos (Mn^{+2} o Co^{+1}) probablemente causan un cambio conformacional el cual: (a) deteriora el

recambio del complejo enzima-sustrato y (b) aumenta la susceptibilidad de la enzima a la inactivación proteolítica.

La falta de efectividad de la subtilisina y pronasa pudo ser debida a los aminoácidos que éstas enzimas producen por sus actividades. Los hidrolizados de caseína y aminoácidos individuales (a 100 mM) también inhiben la inactivación por lisosomas de la arginasa parcialmente purificada de hígado de rata (175).

Las concentraciones de aminoácidos en los lisosomas están en el rango de 60 mM; en el estudio de Bond (59), una concentración baja de isoleucina (38 mM) protege a la arginasa. De acuerdo con esto, las fluctuaciones en las concentraciones de aminoácidos debidas a la dieta o a las condiciones metabólicas pueden afectar la estructura de la arginasa y probablemente la estabilidad de su tiempo de vida media.

Realmente, se ha encontrado que el tiempo de vida media de la arginasa de hígado de rata cambia en respuesta a las variaciones en la dieta de proteína (57). Por ejemplo, en las ratas, el cambio en el suministro de una dieta conteniendo 70 % de proteína a una dieta conteniendo sólo 8 %, ocasionó un aumento en la velocidad de degradación de la arginasa hepática.

Palacios et al (179), demostraron que la arginasa de hígado de rata hidroliza preferencialmente arginina endógena. En este estudio se exploró la posibilidad de una relación funcional cercana de arginasa con los sitios de formación de arginina en el homogeneizado de hígado de rata.

La arginina fué generada a partir de dos fuentes:

a) Citrulina marcada y ácido aspártico (arginina endógena) y b) Arginina hipuril y carboxipeptidasa B (nacimiento artificial de arginina). La formación de arginina a partir de las dos fuentes se muestra en la Fig.11.

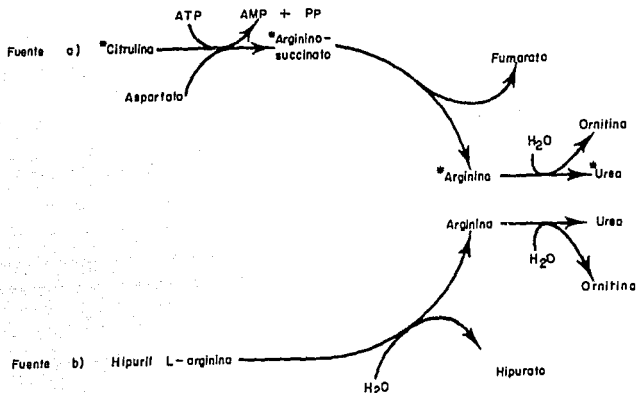


Fig. 11 Formación de arginina a partir de fuente endógena y exógena. (179)

Se utilizó citrulina marcada para distinguir a la arginina producida a partir de la fuente a) de la generada a partir de la fuente b). Las enzimas presentes en el homogeneizado de hígado fueron: 1 Arginino succinato sintetasa, Arginino succinato liasa y 3 Arginasa. Enzima añadida: Carboxipeptidasa B. (74)

Los resultados mostraron que durante los primeros 35 minutos, la producción de arginina a partir de ambas fuentes fué lineal en función del tiempo, siendo la generación de arginina por hipuril L-arginina, apróximadamente 4 veces más rápida; después de 35 min, la velocidad de formación de arginina a partir de ambas fuentes disminuyó, pero la relación de arginina aportada por ellos no fué alterada (Tabla 11).

Durante los primeros 25 minutos, la hidrólisis de arginina obtenida a partir de citrulina fue cerca de 25 % de la hidrólisis de arginina a partir de la otra fuente. Sin embargo, después de este tiempo, la arginina originada a partir de citrulina fué hidrolizada más rápidamente, lo cual causa una caída en la actividad específica de arginina (Tabla 11).

Los resultados indicaron que la arginasa de hígado de rata hidroliza preferentemente arginina endógena sobre arginina exógena, generada por hidrólisis de hipuril arginina a partir de carboxipeptidasa B. Esto sugiere que la arginasa estuvo realmente más disponible para la hidrólisis de arginina generada a través de las enzimas arginino succinato sintetasa y arginino succinato liasa.

Tabla II. Distribución de la producción e hidrólisis de arginina a partir de la fuente endógena y exógena. (179)

Tiempo (min)	a) Fuente de citrulina producida.		b) Fuente de hipuril L-arginina		c) Distribución de la arginina.		d) Distribución de la arginina no hidrolizada.		e) Actividad específica (Cpm/roles)	
	A	U	A	U	f de a)	f de b)	f de a)	f de b)	A	U
7.5	0.042	0.10	0.126	0.47	18	82	20	30	5500	5150
15	0.061	0.27	0.205	1.05	20	80	23	77	6850	5150
25	0.035	0.40	0.160	1.55	20	80	18	32	5150	5790
35	0.012	0.52	0.138	1.95	20	80	8	32	2300	6300
45	0.003	0.47	0.230	1.85	20	80	3	27	1050	5950

A=arginina; U=urea; t=tiempo. Las cantidades de arginina y urea originadas a partir de citrulina y de hipuril L-arginina (columnas a) y b) expresadas como $\mu\text{moles/ml}$ producidas a partir del tiempo cero, fueron inferidas a partir de la cantidad de cada metabolito a un tiempo dado, sus actividades específicas (columna e) y la actividad específica de citrulina.

Inactivación por tratamiento ácido y por acción del agente acomplexante, EDTA.

El estudio realizado por Hosoyama (7), de la inactivación de arginasa de hígado de rata a pH bajo permitió obtener los siguientes resultados:

- 1.- La arginasa de hígado de rata es inactivada por tratamiento ácido a 0°C. El proceso de inactivación consistió al menos en 2 reacciones: entre pH 3 y 5 hubo una pérdida inicial, un

poco rápida pero limitada de la actividad, seguida de una inactivación lenta. A un pH más ácido, la velocidad inicial de desnaturalización aumentó rápidamente y el segundo proceso pareció llevarse a cabo más rápido y contribuir al incremento en la velocidad inicial.

- 2.- La adición de Mn^{+2} (10 mM) no protegió a la enzima contra la desnaturalización por ácido, sin embargo la actividad catalítica de la enzima pudo ser restaurada por incubación de ésta a 37° C en solución de amortiguador neutro, obteniéndose así un 70 a 100 % de la actividad original después de 3 a 5 min.

Una incubación prolongada disminuyó gradualmente la actividad, causada probablemente por algunas reacciones alternas.

- 3.- La cantidad de reactivación que ocurrió fué dependiente de la concentración de iones Mn^{+2} en el medio, (con la adición de 0.5 mM de Mn^{+2} en el medio, la recuperación de la actividad aumenta 15-veces). Una cantidad de Co^{+1} puede ser sustituida parcialmente por Mn^{+2} ; este logró reactivar a la arginasa desnaturalizada en sólo 10 a 15 % del aumento observado con Mn^{+2} .

En presencia de EDTA, la restauración de la actividad enzimática fué completamente inhibida.

- 4.- El proceso de renaturalización se afectó por el pH. Con el uso de Mn^{+2} , el pH óptimo de renaturalización fue cercano al pH neutro. El uso de Mn^{+2} 10 mM en presencia de alta concentración de sal (KCl), hizo que el proceso de renatu-

realización fuera más efectivo.

Por otra parte, el proceso de renaturalización fué dependiente de la temperatura y mostró cinéticas de primer orden.

Aunque las cinéticas de restauración indicaron que el proceso es de primer orden con respecto a la concentración de proteína, esto no necesariamente significa que la arginasa no sea disociada en subunidades.

5.- Para comprobar que la disociación ocurre, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de disco. Esta técnica mostró que ocurrió la disociación de la enzima en subunidades por desnaturalización ácida. Las subunidades obtenidas tienen pesos moleculares de 64,000 y 32,000 a pH 4 y 2 respectivamente, (el peso molecular de la arginasa renaturalizada no pudo ser determinado).

6.- La enzima renaturalizada presentó el mismo pH óptimo (alrededor de 9.5) y K_m (2.5 mM) que la enzima nativa pero perdió su actividad original en la zona de pH neutro.

Hirsch-Kolb et al (68), investigaron las propiedades enlazantes del complejo arginasa-manganeso para la comprensión adicional del mecanismo enzimático así como para la caracterización de la enzima de hígado de rata. Las técnicas de resonancia magnética ofrecieron una herramienta sensible para explorar las interacciones entre la proteína y los iones paramagnéticos. En este estudio se determinó la correlación entre la actividad enzimática y el manganeso enlazante; y entre el

número de sitios enlazantes y las constantes de unión.

Los resultados mostraron que se unen 4 moles de manganeso por mol de arginasa completamente activada. Sin embargo, las afinidades de unión de los iones metálicos a la enzima no fueron idénticas; 50 % del Mn^{+2} estuvo fuertemente enlazado y no pudo ser removido sin ocasionar una considerable pérdida irreversible de la actividad y de la solubilidad de la enzima.

Se efectuaron varios tratamientos como diálisis, electroforesis y quelación del Mn^{+2} por exceso de agentes acomplejantes. Estos tratamientos dieron como resultado una retención del 50% de la actividad original de las preparaciones de enzima. La actividad completa pudo ser recuperada en estas muestras por la adición de Mn^{+2} .

Después de la desnaturalización de la arginasa de hígado de rata con HCl 1.5 N, se demostró que la enzima dializada, con una actividad catalítica residual de 50 %, contuvo 2 moles de manganeso por mol de arginasa (peso molecular = 118, 000 Daltones), sugiriendo entonces que la enzima existió en la forma de un complejo E- Mn^{+2} .

El paso de activación de arginasa a partir de E- Mn^{+2} \rightleftharpoons E- Mn^{+2} resultó en un 100 % de restauración de la actividad catalítica.

Durante ciertos pasos de purificación como por ejemplo cromatografía en columna, tratamiento con alcohol y diálisis, parte del ión metálico de la arginasa se pierde y la actividad específica declina casi a 50 %. Una pérdida de la actividad enzimática

también se observa después de una dilución alta de la enzima (0.01 g de proteína por ml).

Existen muchos ejemplos de enzimas que requieren de la adición de un ión metálico divalente como el Mn^{+2} para la actividad catalítica (por ejemplo quinasas, enolasas y algunas deshidrogenasas) pero en el caso de la arginasa, el manganeso es realmente disociable.

Se puede demostrar una correlación entre la remoción del Mn^{+2} del complejo arginasa y la pérdida de la actividad catalítica por medio de experimentos de diálisis, utilizando Mn^{+2} como rastreador. Parte del manganeso de una muestra de enzima marcada con Mn^{+2} se removió fácilmente por diálisis, y permaneció aproximadamente 50 % de la actividad catalítica. En estas condiciones, la actividad catalítica original puede ser recuperada completamente después de la activación con Mn^{+2} . El contenido de Mn^{+2} de la muestra se mantiene favorablemente constante en la diálisis continua por varios días; en adición, el rango de inactivación de la enzima es pequeño. Se han obtenido resultados similares con respecto a la pérdida de la actividad debida a la disociación del manganeso y recuperación de esta por activación del metal utilizando otros métodos (agentes quelantes, cromatografía en columna utilizando resina quelante, electroenfoque, etc).

La activación del complejo $E-Mn^{+2} \rightleftharpoons E-Mn^{+2}$ mostró ser una reacción muy lenta comparada con muchas otras enzimas que dependen del manganeso, como por ejemplo piruvato cinasa y

enolasa, en las cuales, inmediatamente después de la adición de solución de manganeso, la actividad biológica alcanza su valor total y no se requiere de calentamiento adicional. En el caso de arginasa, la activación por manganeso es dependiente de la temperatura.

Entre pH 7.0 y 9.0, el paso de reactivación mostró ser casi independiente del pH. Los resultados de estos estudios de activación, apoyan la idea de que un cambio en la estructura de la enzima (el cual es comparativamente lento a temperatura ambiente), es el paso limitante de la velocidad en la activación de la arginasa de hígado de rata por manganeso. El sitio de unión del ión metálico enlazante evidentemente no es accesible. Los resultados sugirieron que el manganeso puede estar enlazado en algún compartimento de la molécula proteica.

En conclusión, se dedujo que la arginasa de hígado de rata (la cual une 4 moles de manganeso por mol de enzima), está compuesta por 4 subunidades y tiene cuatro sitios enlazantes para el inhibidor competitivo ornitina. Consecuentemente, se puede asumir que la arginasa tiene cuatro sitios activos con un ión Mn^{+2} unido por sitio.

Si se asume que la arginasa inmovilizada, tratada con EDTA (con una actividad catalítica residual de 50 %) existe en la forma $E-Mn^{+2}$, se puede concluir que esta forma de la enzima es conformacionalmente incapaz de convertirse a la forma $E-Mn^{+2}$ completamente activa debido a la sugerencia que Muszynska et al (201), proponen para una estructura más "rígida" de la enzima in-

movilizada.

Inmovilización.

El uso de enzimas inmovilizadas ha permitido estudiar la actividad en subunidades aisladas de una enzima oligomérica. Para este propósito, las moléculas oligoméricas intactas son ligadas a la matriz vía una subunidad simple y entonces las moléculas no ligadas covalentemente son removidas. De esta manera, la actividad catalítica de las subunidades inmovilizadas puede ser estudiada bajo condiciones en donde la reasociación no es posible (126).

Muzynzka et al (201), estudiaron la influencia de la inmovilización en la conformación de la arginasa de hígado de rata. El método utilizado para la inmovilización de la enzima fué el siguiente:

Se adicionó 1 mg de enzima proteica en amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 conteniendo $MnCl_2$ 50 mM y 500 mg de Sefarosa 4B activada con CNBr. La reacción de acoplamiento fué conducida por 20 h a 4°C con agitación suave. Después de la reacción, el conjugado fué lavado pocas veces con grandes volúmenes de amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, conteniendo $MnCl_2$ 50 mM. Los eluentes finales no contuvieron trazas de proteína ni actividad de arginasa.

En las condiciones descritas, la proteína fué acoplada casi completamente a la Sefarosa 4 B. La actividad de arginasa fijada al soporte fué de 70 % con respecto a la actividad de la

enzima libre (54).

Algunos de los aminoácidos inhibidores de la arginasa libre de hígado de rata, disminuyen en menor grado la actividad de la enzima inmovilizada (Tabla 12).

El tratamiento de ambas formas de arginasa (nativa e inmovilizada con diferentes concentraciones de dodecil sulfato de sodio (DSS), demostró que la enzima insoluble es considerablemente más resistente al efecto desnaturalizante del detergente (Tabla 13).

El agente quelante (EDTA) fuerte inhibidor de la arginasa libre no afectó marcadamente la actividad de la enzima insoluble. Los iones Mn^{+2} previenen la actividad de ambas formas de la enzima contra la inactivación por dodecil sulfato de sodio y EDTA (Tabla 13).

Los resultados de este estudio sugieren que el efecto de la fijación (inmovilización) de la arginasa de hígado de rata en una matriz sólida e insoluble, es el de estabilizar la estructura cuaternaria de la enzima. La enzima inmovilizada se caracteriza por tener una estructura más rígida que la arginasa libre. La unión de la arginasa a la matriz sólida probablemente restringe la transición conformacional de la enzima.

Tabla 12. Efecto de los aminoácidos en la actividad de la arginasa nativa e inmovilizada. (54)

Aminoácido	Concentración de aminoácido (mM)	% de actividad de arginasa	
		Nativa	Inmovilizada
Ninguno	0.0	100	100
Lisina	12.5	66	89
	25.0	31	83
Ornitina	12.5	69	100
	25.0	58	95
Valina	12.5	63	93
	25.0	40	88
Isoleucina	12.5	53	90
	25.0	32	88
	50.0	29	71
Leucina	25.0	61	91
	50.0	44	85
Cisteína	12.5	33	69
	25.0	60	66

Condiciones del ensayo: lisina, ornitina, valina, isoleucina, leucina o cisteína fueron preincubadas con la enzima por 15 min, pH 7.2 a 30°C. La concentración final de cada aminoácido en la mezcla incubada varió de 12.5 a 50 mM.

Tabla 13. Influencia de la preincubación con iones manganeso y con dodecil sulfato de sodio (DSS) o EDTA sobre la actividad de la arginasa nativa e inmovilizada. (54)

Condiciones de la preincubación	% de actividad de arginasa	
	Nativa	Inmovilizada
Arginasa + Mn^{2+}	100	100
Arginasa + DSS	6	19
Arginasa + DSS + Mn^{2+}	91	72
Enzima tratada con EDTA	0	58
Enzima tratada con EDTA, después de la reactivación con Mn^{2+}	100	55

Condiciones del ensayo: la enzima fué preincubada por 15 min con DSS a pH 7.2 con y sin Mn^{2+} 2 mM. La arginasa nativa fué preincubada con 0.005 l (0.175 mM) de DSS y la enzima inmovilizada con 0.02 l (0.7 mM) de DSS. Para el efecto del EDTA, las dos formas de arginasa se preincubaron con EDTA 10 mM, pH 7.5 a 30°C por 15 min. Después, se adicionó la cantidad equimolar de Mn^{2+} . Las condiciones de la segunda preincubación fueron las mismas que para la primera.

Se ha estudiado si la estructura cuaternaria de las enzimas oligoméricas con subunidades idénticas, o la estructura terciaria de una sola subunidad es suficiente para la expresión de las propiedades catalíticas de una enzima; para esto se han utilizado dos aproximaciones experimentales que son: la reacción de disociación / reasociación del oligómero y las propiedades catalíticas de los intermediarios en sistemas heterogéneos después de la inmovilización inicial de una subunidad en el oligómero (76,77) o en solución homogénea (78). Los procesos estudiados en éstos sistemas pueden ser representados en el esquema de la Figura 12.

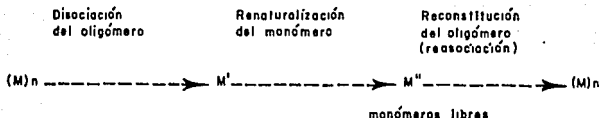


Fig. 12 Representación esquemática de la disociación y reasociación de enzimas oligoméricas. (78)

$(M)_n$ = oligómero; M' = monómero activo (sin cofactores y/o parcialmente desdoblados y M'' = monomero renaturalizado después de la adición de cofactores y remoción del solvente desnaturizante).

En varios estudios en donde se han utilizado agentes caotrópicos para disociar al oligómero, se ha encontrado que el monómero renaturalizado, M'' , posee una actividad baja comparada con la actividad por monómero en la enzima oligomérica. Esto se aplica tanto a estudios en oligómeros en solución o en el monómero inmovilizado M' , que es renaturalizado por remoción de los agentes caotrópicos en un paso. El último puede enlazar monómeros libres por lo que el oligómero reconstituido tiene una actividad similar a la del oligomero original. La conclusión que se obtiene de estos estudios es que el monomero M'' es inactivo. Sin embargo, esto también puede indicar que ésta especie de monómero no fué formada bajo estas condiciones experimentales. Por ejemplo, esto ha sido observado para varias enzimas inmovilizadas (lactato deshidrogenasa, fumarasa, etc.)

Cuando se usaron condiciones de disociación suaves como cambio en el pH o remoción del cofactor (por ejemplo, iones metálicos) y la renaturalización se desarrolló bajo condiciones suaves, se encontró que los monómeros M' fueron completamente activos (76-78). Esto también se aplica a los monómeros producidos por solventes caotrópicos si la renaturalización se desarrolla por remoción gradual del agente caotrópico en presencia de agentes de intercambio de disulfuro (ditioeritrol).

El que en algunos casos la actividad del monómero no pueda ser restaurada, se atribuye a las condiciones experimentales, las cuales no permiten que el proceso de M'--- M'(renaturalización) se lleve a cabo, antes de la reconstitución del oligómero. En solución, el monómero renaturalizado se puede formar antes de que M' haya formado un complejo con otros monómeros. En este caso, un monómero activo aislado, M'', no puede ser analizado directamente. Este problema se puede solucionar usando monómeros inmovilizados en donde el proceso M'--- M' se puede desarrollar sin la asociación de los monómeros que interfieren. Otros datos indican que para algunas enzimas oligoméricas, la estructura cuaternaria es necesaria para la expresión de la actividad catalítica. Para otras, la estructura terciaria es suficiente (77).

En el caso de oligómeros y monómeros inmovilizados, se debe verificar que la actividad catalítica sea directamente proporcional al contenido de sitio activo. Esto apenas se ha realizado.

En el estudio de Aguirre y Kasche (79) de la arginasa de

hígado de rata por el método de inmovilización, se consideraron los factores que influyen en las cinéticas de las enzimas inmovilizadas, al ser comparadas con la enzima en solución. Para la arginasa de hígado humano, estudiada por el mismo método, los resultados indicaron que el monómero renaturalizado es activo (76). Sin embargo, en ese estudio no se demostró que la actividad en las preparaciones de enzima cruda fuera directamente proporcional al contenido de enzima (n=1).

Se ha reportado que la arginasa de hígado de rata es un tetrámero con un peso molecular de 120,000 Daltones (60). La filtración en gel de las preparaciones crudas revelan cantidades pequeñas pero significativas de actividad de arginasa que corresponden a especies de pesos moleculares de cerca de 30,000 Daltones. Esto indica que las subunidades activas y los tetrámeros existen simultáneamente. Debido a esto, se estudiaron las propiedades catalíticas de los monómeros producidos por disociación del tetrámero de arginasa con el objeto de determinar la función de ambas formas (79).

Se han reportado 2 procesos que producen la disociación de la arginasa de hígado de rata y que son relativamente suaves: la remoción del catión activador Mn^{+2} por acción del EDTA (54,59), y la incubación del oligómero a pH 2.7 (55). Los monómeros producidos por éstos métodos pueden ser renaturalizados mediante la adición de Mn^{+2} o por restauración del pH neutro (55). Las subunidades renaturalizadas se pueden usar para la purificación de la arginasa libre por cromatografía de intercambio iónico.

Aguirre y Kasche (79) unieron covalentemente la arginasa de hígado de rata en columnas de Sefarosa y al tetrámero unido a la matriz que resultó de esto, lo disociaron subsecuentemente por tratamiento ácido o por tratamiento con EDTA. Los derivados inmovilizados que permanecieron en la matriz, fueron renaturalizados (con el cofactor Mn^{+2}) y analizados en términos de actividad recuperable antes y después de la incubación con la enzima soluble. La actividad de la enzima inmovilizada se determinó bajo condiciones en donde la actividad es proporcional al contenido de enzima.

Los resultados de este estudio mostraron que la enzima inmovilizada tratada con ácido, la inmovilizada tratada con EDTA y la arginasa de hígado de rata inmovilizada renaturalizada, tuvieron cerca de un cuarto de la actividad de la enzima inmovilizada no tratada. Después de la reasociación con la enzima libre, la actividad de la enzima renaturalizada inmovilizada fué de 85 % (oligómero disociado con ácido) y de 60 % (oligómero disociado con EDTA) con respecto a la actividad del oligómero inicialmente inmovilizado. La arginasa disociada por ácido y la arginasa inmovilizada renaturalizada, tuvieron un valor de K_m de 18 mM, que es aproximadamente 4 veces el valor de K_m obtenida para la enzima tetramérica inmovilizada (3.4 mM). Después de la renaturalización y reasociación con enzima libre, se encontró que el valor de K_m fué igual al valor del oligómero inmovilizado después de la disociación. Esto indica que la enzima disociada, inmovilizada y renaturalizada es monomérica.

Los iones Mn^{+2} normalmente asociados con la arginasa oligomérica, se remueven fácilmente lavando con solución de amortiguador libre de Mn^{+2} . Por otro lado, el tetrámero inmovilizado no pierde Mn^{+2} después de este proceso y el ión parece estar unido hasta en una forma más fuerte que en el caso del tetrámero libre. El oligómero reconstituido tuvo un valor de K_m aproximado al valor del oligómero ligado inicialmente.

A partir de los resultados de este estudio, se concluyó que el oligómero de arginasa de hígado de rata puede ser disociado en monómeros idénticos (se obtuvieron más de 70 % de subunidades) que son catalíticamente activos después de la reasociación con el cofactor (Mn^{+2}) a pH neutro. Así, para la arginasa de hígado de rata, la estructura terciaria puede ser suficiente para la expresión de la función de esta enzima. Las estructuras cuaternarias parecen ser de importancia, al menos en la arginasa, para la regulación de la actividad de la enzima y su estabilidad con respecto al cofactor enlazado.

La subunidad inmovilizada producida por disociación con ácido tuvo un valor de K_m significativamente mayor que el monómero producido por disociación con EDTA. Esto sugiere que las subunidades inmovilizadas, obtenidas por tratamiento con ácido o con EDTA, tienen diferentes estados conformacionales y no se sabe aún si estos estados conformacionales son interconvertibles.

Una diferencia sorprendente se observó entre el tetrámero libre y el inmovilizado con respecto a sus afinidades por Mn^{+2} .

La forma soluble pierde fácilmente 2 de sus 4 iones por diálisis (61). Los tetrámeros inmovilizados pierden solo una pequeña fracción de su actividad después de lavar con grandes cantidades de solución de amortiguador. El tratamiento con EDTA indicó también, que el oligómero inmovilizado es más estable a la disociación que el oligómero libre.

La importancia de la estructura cuaternaria en la estabilización, es demostrada por el hecho de que el lavado de las subunidades inmovilizadas con solución amortiguadora libre de Mn^{+2} , produce un grado considerable de inactivación irreversible. A este respecto, la observación fué usada para probar que la fracción de arginasa tetramérica es insignificante en la enzima disociada y renaturalizada.

La concentración de Mn^{+2} necesaria para obtener la actividad máxima (0.005 M) de la enzima soluble es considerablemente mayor que la concentración encontrada en el citoplasma de los hepatocitos (0.01 M). Estudios publicados anteriormente, indican que la arginasa asociada con las membranas mitocondriales tiene una afinidad más alta por el Mn^{+2} que la enzima soluble y que la solubilización de la enzima enlazada, disminuye su afinidad por Mn^{+2} (79).

Arginasa en Hígado de rata.

Hirsch-Kolb et al (53), estudiaron las propiedades de arginasa de hígado de rata (cepa Sprague-Dawley) purificada aproximadamente 1,500 veces a partir de una modificación del

método de Schimke (60).

El peso molecular de la arginasa de hígado de rata (actividad específica = 19,500 moles de urea /min a 25°C por mg de nitrógeno protéico) determinado por el método de equilibrio de sedimentación fué de 118,000. La constante de velocidad de sedimentación es 6.1 S y el coeficiente de difusión, determinado en una ultracentrifuga analítica es 5.2×10 cm /seg. A partir de los datos obtenidos de los experimentos de difusión y equilibrio de sedimentación, se obtuvo un valor de coeficiente friccional de 1.26.

La alteración en el pH, remoción de Mn^{+2} , y reemplazamiento de Mn^{+2} por Co^{+1} no produjo evidencia de un cambio en el tamaño molecular (Tabla 14).

El volumen parcial específico (V), se determinó por medio de una técnica diferencial de equilibrio de sedimentación en agua pesada y se obtuvo un valor de $V = 0.75$ ml por g. La disociación de la enzima en urea 8 M, produjo una proteína con un peso molecular de 30,800, determinado a través del análisis de equilibrio de sedimentación (Tabla 15); a partir de esto se deduce que la arginasa de hígado de rata está compuesta por 4 subunidades. Después de la electroforesis en gel de acrilamida de la enzima disociada, se obtuvo una banda simple de proteína, lo cual sugiere que las subunidades de arginasa son idénticas.

Tabla 14. Efectos del pH, remoción de Mn^{2+} y sustitución por Co^{2+} en la actividad enzimática y en la conducta de sedimentación de la arginasa de hígado de rata. (33)

Muestra	Ión metálico	pH	Concentración de proteína mg/ml	Actividad		s 20. w
				pH 9.5	pH 6.5	
				X	S	S
I. Enzima nativa	Mn^{2+}	5.8	2.7	78	12	5.9
	Mn^{2+}	7.0	5.0	100	15	5.8
	Mn^{2+}	8.3	6.7	97	13	5.8
	Mn^{2+}	9.8	6.3	92	14	5.8
II. Enzima dializada contra EDTA 5 x 10 μ M		7.5	4.5	22	5	5.8
III. Muestra II dializada contra $Co(NO_3)_2$ 5 x 10 μ M	Co^{2+}	7.5	3.2	28	32	5.8

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo espectrofotométricamente a pH 9.5 (óptimo) y pH 6.5. El aumento de actividad de la muestra III a pH 6.5 refleja el cambio de la curva de pH óptimo de la arginasa cuando se usa el Co^{2+} como ión metálico activante. Una unidad de enzima es definida como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de urea por minuto a 25°C.

Tabla 15. Peso molecular de la arginasa de hígado de rata y de su unidad polipeptídica, determinado por velocidad de sedimentación y por equilibrio de sedimentación en ultracentrifugación. (33)

Preparación	Método de determinación	M_w	M_s (promedio)
Enzima nativa	s y D	116,000	
	Equilibrio de sedimentación	118,000	120,000
Subunidad (en urea 8 M)	Equilibrio de sedimentación	30,800	31,000

La tabla 16 representa la composición de aminoácidos de la arginasa de hígado de rata.

Tabla 16. Composición de aminoácidos de la arginasa de hígado de rata. (53)

Aminoácido	No. de residuos por mol de arginasa *
Lisina	87.3
Histidina	23.1
Arginina	32.5
Acido aspártico	87.0
Treonina	88.1
Serina	60.0
Acido glutámico	87.0
Prolina	71.1
Glicina	90.0
Alanina	84.2
Cisteína	7.2
Valina	85.8
Metionina	12.8
Isoleucina	51.0
Leucina	71.1
Tirosina	24.0
Fenilalanina	31.0
Triptofano	12.2

* Los valores son los promedios de tres experimentos diferentes.

Hirsch-Kolb et al (61) a partir de sus estudios, reportaron que la arginasa de hígado de rata es una especie molecular sencilla. Se encontró que esta enzima tiene un contenido de nitrógeno comparativamente bajo (14.3 %). El volumen parcial específico V , calculado a partir de la composición de aminoácidos fué 0.74 ml por g. Este valor concuerda bien con el valor determinado experimentalmente. Los autores sugirieron que la proteína contiene poca cantidad de hexosa unida.

A partir de los resultados obtenidos de la disociación de

la arginasa de hígado de rata con urea, se concluyó que la enzima está compuesta por 4 subunidades de cadenas polipeptídicas con un peso molecular de cerca de 30,000 Daltones.

Arginasa de Hígado de gallina.

La función de la arginasa en el hígado de gallina (unida a la mitocondria y al núcleo (178) aún no se conoce y hasta existe la duda de que ésta enzima pueda hidrolizar arginina endógena ya que tiene una Km alta para este aminoácido (100 mM) y un número de recambio muy bajo 2,970 mol/mol de enzima por min a 37°C y pH 9.5 (80).

Aunque la gallina es uricotélica y no posee un ciclo de la urea en ningún tejido, las células del riñón contienen una alta concentración de arginasa ligada a la matriz mitocondrial, la cual aparentemente funciona en la regulación de la dieta de arginina (178).

En contraste con la arginasa de hígado de rata que es una proteína básica (56), la arginasa de hígado de gallina es una proteína muy ácida.

Grazi et al (81), compararon la composición de aminoácidos de la arginasa de hígado de gallina con la arginasa de hígado de rata (Tabla 17).

La arginasa de hígado de rata que es una proteína básica, a una fuerza iónica baja, está aparentemente unida al núcleo y a la fracción microsomal, mientras que a la fuerza iónica intracelular, se encuentra presente como una forma soluble en el cito-

plasma. La arginasa de hígado de gallina está unida a la mitocondria y al núcleo y puede ser extraída satisfactoriamente solo por detergentes no iónicos tales como el Tritón X-100. La enzima de hígado de gallina, restringida a la mitocondria y al núcleo, puede desarrollar una acción hidrolítica selectiva quizá limitada a una concentración particular de arginina. Esto puede ser necesario para evitar una hidrólisis indistinta de arginina, que es un aminoácido esencial para la gallina. Sin embargo, la concentración de la actividad de arginasa dentro de un área pequeña, puede localmente aumentar la eficiencia de la enzima. La necesidad para semejante concentración puede ser apreciada considerando que el número de recambio de la arginasa de hígado de gallina (2970 mol/mol de enzima por min a 37°C y pH 9.5) es significativamente menor que el número de recambio de la arginasa de hígado de rata 327 600 mol/mol de enzima por min a 25°C y pH 9.5 (53).

Tabla 17. Composición de aminoácidos de la arginasa de hígado de rata comparada con la arginasa de hígado de gallina. (53)

Aminoácido	Composición (mol de aminoácido/100.000 g de arginasa)	
	Hígado de rata (53)	Hígado de gallina (160)
Lisina	73.9	42.6
Histidina	19.5	15.5
Arginina	27.5	47.1
Acido aspártico	73.7	34.7
Treonina	57.7	41.8
Serina	50.8	50.1
Acido glutámico	73.7	123.5
Prolina	60.2	47.0
Glicina	76.2	74.0
Alanina	54.2	74.1
Cisteína	6.1	17.7
Valina	73.6	66.6
Metionina	10.8	15.5
Isoleucina	43.2	38.6
Leucina	60.2	30.1
Tirosina	20.3	23.1
Fenilalanina	26.2	30.0
Triptofano	10.3	12.6

Arginasa de hígado de conejo.

Vielle-Breitburd et al (49), purificaron la arginasa de hígado de conejo cerca de 1000 veces y determinaron sus propiedades. Los pasos de la purificación se muestran en la Tabla 18.

La arginasa de hígado de conejo migra como una sola banda durante la electroforesis en gel de disco y dá una línea de precipitación con antisuero específico de oveja cuando se ensaya por la técnica de inmunodifusión. Sin embargo, la cromatografía de la enzima purificada en columnas de DEAE celulosa, revela múltiples formas activas con pesos moleculares idénticos.

El peso molecular de la enzima de hígado de conejo determi-

nado por filtración en gel, produce un valor de 110,000 y el coeficiente de sedimentación determinado por centrifugación en gradiente de sacarosa es 5.9 S. El punto isoeléctrico de la enzima determinado por la técnica de isoelectroenfoque, es cercano a pH 7.2.

Tabla 18. Purificación de la arginasa de hígado de conejo. (49)

Pasos	Vol.	Act. total	Proteína total	Act. recuperada	Act. específica
	ml	unidades	mg	%	unidad/mg
1. Homogeneizado	535	47,000	21,000	100	2.2
Sobrenadante del homogeneizado	400	46,000	9,000	98	4.6
2. Calentamiento	358	44,700	2,200	95	20.3
3. Acetona	72	42,800	1,000	91	40.5
4. Sulfato de amonio	27	33,800	300	72	112.5
5. DEAE-Celulosa	5.2	26,400	43	56	612
6. Sefadex G-200	66	18,300	7.4	39	2,460

Una unidad de enzima es la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de urea por min a 37°C. Después de la liofilización y redisolución. Pasos 5 y 6: cromatografía en DEAE-Celulosa y Sefadex G-200.

La arginasa de hígado de conejo es inactivada casi completamente después de una incubación prolongada con EDTA, sin que ésto altere su patrón de inmunoprecipitación. La enzima recupera su actividad inicial cuando se ensaya en presencia de Mn^{2+} (Tabla 19).

El tratamiento de la arginasa de hígado de conejo con

0.025 % de dodecil sulfato de sodio a pH 10 , o la incubación de la enzima a pH 2.0, da como resultado la inactivación rápida de ésta, cuando se ensaya en ausencia de Mn^{+2} . Sin embargo, cuando la actividad de la enzima inactiva se ensaya en presencia de Mn^{+2} , se observa una actividad residual que corresponde a un componente de 2.8 S después de ser tratada con dodecil sulfato de sodio, o a un componente de 2.4 S a pH 2.0.

Tabla 19. Activación de la arginasa de hígado de conejo purificada y activación de su extracto crudo. (49)

Ensayo enzimático	Actividad de arginasa	
	Extracto crudo	Enzima a partir del sexto paso de purificación.
En EDTA 1.5 mM	1.75	1950
En $MnCl_2$ 1.5 mM:		
Sin incubación preliminar	2.10	2150
Con incubación preliminar	3.50	2050

El extracto crudo se obtuvo después de centrifugar el homogeneizado en solución de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4 durante 20 min a 13,000 x g. Las actividades específicas se expresan en μ moles de urea liberada/mg de proteína/min a 55°C.

La enzima disociada con dodecil sulfato de sodio tiene un peso molecular de 36,500. A partir de esto se deduce que la arginasa de hígado de conejo posee una estructura oligomérica nativa, probablemente tetramérica. La enzima disociada a pH 2.0, migró como dos componentes con movilidades muy similares durante

la electroforesis utilizando urea 8 M, lo cual sugirió la presencia de dos clases de subunidades con pesos moleculares similares. Esto puede ser valido para las diferentes formas cromatográficas de la enzima oligomérica nativa.

Cuando la enzima disociada a pH 2.0, se incuba a pH 8.0 en presencia de Mn^{2+} , y adicionalmente se ensaya en presencia de Mn^{2+} , ésta recupera su estructura oligomérica nativa como lo sugieren su coeficiente de sedimentación (5.6 S), sus propiedades inmunológicas y su movilidad electroforética. Si la enzima disociada a pH 2, es incubada a pH 8.0 con EDTA, cerca del 25 % de la actividad inicial es observada, cuando esta es ensayada en presencia de Mn^{2+} . Bajo estas condiciones, la enzima tiene un coeficiente de sedimentación bajo (2.7 S) y proporciona dos bandas que migran más rápido que la banda de la enzima nativa, durante la electroforesis en gel de disco. Así, la formación de una estructura oligomérica requiere de iones manganeso. Además, las subunidades son probablemente más activas en presencia de Mn^{2+} , como lo sugieren las características del ensayo de la actividad con enzimas disociadas.

Arginasa de hígado de vaca.

Harell et al (119), aislaron y determinaron las propiedades de la arginasa de hígado de vaca. Se considera que la purificación de esta enzima es difícil. En este estudio se desarrolló un método de purificación que permitió obtener una preparación pura y activa de arginasa de alrededor de 630 veces. Los pasos utili-

zados en el método de purificación, se resumen en la Tabla 20.

Aparentemente durante ciertos pasos de la purificación, como por ejemplo en el isoelectroenfoco, parte del ión metálico se pierde y la actividad específica decae a 70-80 %. Sin embargo, la actividad puede ser restaurada por tratamiento con calor (50°C) en presencia de Mn^{+2} . La Km para la preparación de enzima (cristalizada) a partir del séptimo paso de la purificación es 0.95 mM.

Tabla 20. Purificación de la arginasa de hígado de vaca. (119)

Paso	Vol.	Proteína total	Act. específica	Act. total	Producción
	ml	mg	Unidad/mg	Unidades	%
1. Homogeneizado a partir de 1.8 kg de hígado	4730	18,000	1.25	205,000	
2. Acetona	1910	13,580	0.50	129,000	63
3. Calentamiento	1640	8,040	15.10	121,400	59
4. DEAE-Celulosa	50	2,300	44.40	102,000	50
5. Filtración en Bio-Gel P-150	33	410	200	82,000	40
6. Sefadex-SE	41.6	100	575	57,400	28
7. Isoelectroenfoco	19	28.2	790	20,700	10.2

Una unidad de arginasa es la cantidad de enzima que produce 1 μ m de urea por min a 25°C. Pasos 4 y 6: Cromatografía en DEAE-Celulosa y Sefadex-SE.

La arginasa de hígado de vaca es homogénea al ser sometida a la electroforesis en disco y a la ultracentrifugación; es una

proteína ligeramente ácida (pH 5.9) que tiene un peso molecular de 120,000 determinado a partir del análisis de aminoácidos. El peso molecular obtenido por equilibrio de sedimentación es 115,000. La Tabla 21 muestra la composición de aminoácidos de la arginasa de hígado de vaca.

Se ha reportado que la arginasa de hígado de vaca es hidrolizada en subunidades con pesos moleculares de 30,000, estimados por filtración en gel sobre Sefadex G-200 (83). La preparación obtenida por Harell et al (119), no muestra este comportamiento sobre cromatografía en Biogel P-150. Además, el tratamiento de la enzima con EDTA, no causa ningún cambio en la conducta de sedimentación. Los descubrimientos anteriores han indicado que que el tratamiento de la enzima con ácido (pH 2.6), produce especies con un s_{w} de 3.6 S comparado con el $s_{w} = 6$ S de la enzima nativa (44). Sin embargo está por aclararse si la arginasa de hígado de vaca se disocia en subunidades y su posible asociación en agregados.

La arginasa de hígado de vaca es una metaloenzima que fija 4 átomos de Mn^{2+} , los cuales son esenciales para la actividad enzimática. Esta enzima también requiere de la presencia de iones manganeso para la estabilidad (Tabla 22).

Tabla 21. Composición de aminoácidos de la arginasa de hígado de vaca. (119)

Aminoácido	Cantidad en la enzima	
	Residuos/120.000g. de proteína	
Lisina	87.2	
Histidina	30.2	
Arginina	40.5	
Acido aspártico	93.7	
Treonina	59.8	
Serina	48.1	
Acido glutámico	95.7	
Prolina	72.1	
Glicina	108.0	
Alanina	59.5	
Valina	89.9	
Metionina	15.5	
Isoleucina	64.1	
Leucina	108.1	
Tirosina	34.7	
Fenilalanina	36.2	
** Triptofano	9.5	
* Cisteína	18.1	

* Determinado como ácido cisteico.

** Determinado espectrofotométricamente.

Tabla 22. Dependencia de la actividad de arginasa en homogenizados de hígado de vaca sobre la concentración de iones manganeso. (119)

Concentración de Mn ²⁺	Proteína	Actividad total	Actividad específica
mM	mg/ml	unidades	unidades/mg
0	35.0	112.2	3.3
5	35.0	143.6	4.1
10	30.5	156.6	5.1
50	24.5	238.0	9.7
100	32.5	240.1	7.1
200	48.0	256.0	5.8

La diálisis de la arginasa de hígado de vaca durante 24 h, causa una reducción en la actividad en un 70 a 80 % mientras que la proteína retiene aproximadamente 1 átomo de Mn^{+2} por mol de proteína. La activación con Mn^{+2} restaura un 90 a 95 % de la actividad original.

Se ha reportado que la enzima de hígado de vaca no interactúa químicamente con la arginino succinato liasa (45).

En un estudio posterior Kuchel et al (37), demostraron que la arginasa de hígado de vaca se asocia de una manera homogénea con ureasa utilizando solución de amortiguador a pH 7.5. Los investigadores reportaron que esta enzima es homogénea hasta en alta dilución. Las siguientes observaciones confirmaron lo mencionado: a) En el isoelectroenfoco se observó una sola banda de actividad a pH 5.9. b) La electroforesis en gel de poliacrilamida reveló una banda simple con un R_f de 0.28. c) Varios experimentos en donde se utilizó una ultracentrífuga para determinar la velocidad de sedimentación, revelaron un solo pico de actividad.

El peso molecular de la arginasa de hígado de vaca que se obtuvo en este estudio fué de $114,000 \pm 3,000$. Este valor se puede comparar con los valores de 112,000 y 115,000 reportados por Harell et al (119).

Kuchel et al (37), reportaron que la enzima de hígado de vaca existe como especies simples no interactuantes dentro de un rango de concentración entre 1.0 a 0.01 g/dl. La ornitina actuó como inhibidor competitivo lineal ($K_i=3.1 \text{ mM}$) sobre la enzima

de hígado de vaca en solución de amortiguador de Tris, pH 7.5. Para varias preparaciones de arginasa, las gráficas de doble recíproco de Lineweaver-Burk mostraron ser lineares a varias concentraciones de sustrato (1 a 10 mM) y se obtuvo un valor de $K_m = 5 \pm 1$ mM para la arginina.

Ruegg et al (19), desarrollaron un método en el cual utilizaron L-[guanido- $1-^{14}C$] arginina como sustrato. La arginina no hidrolizada fué removida con resina en un proceso de lote continuo y el producto [$1-^{14}C$]-urea se determinó cuantitativamente en el sobrenadante. Con este método, a partir de las curvas de doble recíproco, se obtuvo un valor de $K_m = 10.8$ mM para la arginasa de hígado de vaca, el cual se puede comparar con el valor antes reportado (11mM a pH 8.4) por Hunter et al (63).

El pH óptimo para la arginasa de hígado de vaca es 9.5-10.5. Su activación por tratamiento con calor, en presencia de iones manganeso, no causó un cambio drástico en la actividad enzimática. Otros investigadores han encontrado que la actividad de arginasa presente en diferentes tejidos, disminuye como consecuencia del tratamiento con calor (33,36). Sin embargo, el ión manganeso estabiliza a la enzima (33,59) y a las soluciones comunes que se almacenan en presencia de Mn^{2+} .

Se ha mostrado que el sustrato N- α -acetil-L-arginina para la arginasa de hígado de vaca, experimenta hidrólisis en un 4 % de la velocidad inicial de la arginina y que este sustrato es más activo que otros análogos de arginina -sustituídos (86) (Tabla 23).

Tabla 23. Actividad de los análogos de arginina como sustratos para la arginasa de hígado de vaca. (59)

84

Sustrato	(M)	Arginasa (mg)	Tiempo de incubación (min)	Actividad específica
L-arginina	0.25	0.0019	10	137
γ -Acetil-L-arginina	0.25	0.0038	10	5.35
L-Homoarginina	0.15	0.048	30	2.70
γ -Carbamido-L-arginina	0.025	0.036	30	2.87
γ -Hidroxi-L-arginina	0.15	0.048	30	0.05

Expresada como la concentración al inicio de la incubación.

La actividad específica ($\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$) es expresada para 38 °C. La actividad a 38 °C es 2.8 veces la actividad a 25 °C.

Pace et al (14), han sugerido que los diferentes valores de Km reportados para las enzimas de hígado de vaca y rata (0.3 a 20 mM), se deben en parte a la diversidad de los ensayos disponibles. Lo mismo es válido para las diferentes conclusiones obtenidas acerca de la función del Mn^{+2} en la activación.

Estos investigadores confirmaron los resultados anteriores de que las arginasas de hígado de vaca y de hígado de rata, fijan 1 mol de Mn^{+2} por subunidad (44,59) y de que éstas enzimas son activadas por calentamiento en presencia de una alta concentración de Mn^{+2} (59); generalmente con Mn^{+2} 50 mM durante 5 min a 55°C (60). Sin embargo, afirman que es menos cierto que la enzima activada resultante se asemeje a la arginasa existente "in vivo". La concentración total de Mn^{+2} en el hígado de rata es aproximadamente 0.024 mM (1.3 g/g de hígado) y la concentración de Mn^{+2} libre, es considerablemente menor. Así, distintas condiciones no fisiológicas se han utilizado para activar a la arginasa y por lo tanto hay discrepancias entre los resultados publicados.

Pace et al (14), recomiendan el uso de concentraciones menores de Mn^{+2} y temperaturas relativamente bajas para la activación de la arginasa de hígado de rata. La Tabla 24 muestra que se obtuvieron resultados muy similares cuando la enzima fué activada a una temperatura menor (37°C) en presencia de Mn^{+2} 0.05 o 5 mM. El uso de una concentración inapropiada de sustrato, es probable que también contribuya a obtener errores en los valores de Km.

Tabla 24. Constantes de Michaelis-Menten para la hidrólisis de L-arginina a través de la arginasa de hígado de rata. (14)

Concentración de Km ² (mM)	Km	
	pH 7.5	pH 9.5
0.05	1.55 ± 0.16	1.03 ± 0.13
5	2.33 ± 0.13	1.13 ± 0.13

Cada valor de Km representa la media ± E.E. (error estándar).

A partir de éste estudio, los valores de pH óptimo reportados para las arginasas de hígado de vaca y de hígado de rata fueron entre pH 9.0 y 10.5. Los valores de Km obtenidos fueron: 1.0 mM para la arginasa de hígado de vaca; 2 mM para la enzima de hígado de rata y 1.4 mM para la arginasa de hígado de conejo.

Isoenzimas de Arginasa en Hígado de Rata.

La caracterización de isoenzimas de la arginasa se ha venido realizando a través de los años con el propósito de entender la relación que existe entre las características de las isoenzimas de arginasa y la función fisiológica de cada forma.

Tarrab et al (38) después de purificar la arginasa de hígado de rata de 2,500 a 5,000 veces, separaron tres formas moleculares diferentes en columnas de CM-celulosa, las cuales fueron purificadas 2,500-5,000 veces, 800-1,000 veces y 600-1,000 veces, respectivamente. Estas tres formas moleculares fueron

también identificadas por cromatografía en el sobrenadante de los extractos de tejido. Sin embargo, la técnica de cromatografía por afinidad, utilizando Sefarosa-lisina como inhibidor competitivo de la arginasa, mostró una forma principal. La Tabla 25 muestra el método de purificación utilizado.

Se realizaron estudios cinéticos para 2 de las 3 formas moleculares aisladas. El valor de K_m para la arginasa obtenida a partir del segundo paso de purificación fué 3 mM. Las dos formas aisladas después de la segunda cromatografía en CM-celulosa exhibieron constantes de Michaelis-Menten similares para L-arginina. La K_m para ambas formas moleculares 1 y 2, fué 6 mM a pH 9.7, y a pH 7.0 se obtuvieron valores de 9 y 6 mM, respectivamente. Si no se incluyen cationes divalentes en el sistema de ensayo, las K_m no cambian. Una concentración de arginina de 300 mol, inhibió en un 30 % a la forma molecular 1 y en un 43 % a la forma molecular 2, a pH 9.7. El pH óptimo para las dos formas moleculares fué 9.5-9.7.

En el estudio del efecto de la temperatura, se encontró que hubo diferencias importantes en los valores de la energía de activación (E_a) para las dos formas moleculares principales. Estas diferencias persisten a dos diferentes concentraciones de Mn^{+2} (0 y 1 mM) y a dos diferentes valores de pH (7.0 y 9.7). Bajo éstas mismas condiciones, no hubo diferencias en los valores de la energía de desnaturalización (E_d) para ambas formas moleculares y éstas presentaron una gran estabilidad a pH 7.0, lo cual indicó que existe una asociación fuerte de las cuatro

Tabla 25. Purificación de la arginasa de hígado de rata. (38)

Paso	Vol.	Act. total	Proteína total	Act. específica	Producción	Purificación
	ml	unidades	mg	unidades/mg	g	veces
1. Homogenizado	640	128,000	47,200	2.71	100	1
2. Sobrenadante del homogenizado	432	144,000	13,824	10.41	113	3.84
3. Acetona	356	140,000	5,908	23.72	109.5	8.75
4. Primer tratamiento con calor	316	116,000	1,516	76.51	90.6	28.23
5. Segundo tratamiento con calor	300	124,000	1,476	84.00	96.97	30.99
6. CM-celulosa	30	108,800	246	434.15	83.43	160.20
7. Sulfato de amonio (40%)	5	40,800	17.6	2318.18	31.97	355.40
8. CM-celulosa	5	24,000	4.8	5000.00	18.75	1845.01

La producción corresponde al pico principal. Una unidad de arginasa es la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de urea a 37°C. Pasos 6 y 7: Cromatografía en CM-celulosa y sulfato de amonio.

ub-unidades a ese valor de pH.

En comparación con la actividad observada en ausencia de Mn^{+2} , Co^{+1} o Ni^{+3} ; estos iones aumentaron la actividad de ambas formas moleculares de arginasa, a pH 9.7. Los iones también fueron eficientes en la estabilización de ambas isoenzimas al mismo pH. Cuando las dos formas moleculares fueron preincubadas en ausencia del ión metálico a pH 7.0, se observó que ocurrió

cierta desnaturalización de éstas. El Mn^{+2} efectuó una restitución total de la actividad enzimática, pero éste efecto no fué observado con Co^1 y Ni^{+3} . Estos iones se comportaron de una manera diferente en la restauración de la actividad de las isoenzimas, por lo que es muy probable que se pueda obtener una conformación apropiada a través de la interacción de ciertas combinaciones de iones metálicos.

Las isoenzimas de arginasa purificadas y aisladas a partir del último paso en cromatografía con CM-celulosa, fueron sometidas a la electroforesis. A pH 5.5, se observaron dos picos de actividad que migraron hacia el cátodo y casi toda la actividad de arginasa estuvo asociada con ambas bandas.

El peso molecular determinado por filtración en gel fué de 110,000 a 115,000 para ambas formas de arginasa. De las placas de inmunocromatografía; una combinación de técnicas para los ensayos del peso molecular e inmunodifusión, se obtuvo un solo pico de actividad con un peso molecular igual al determinado por filtración en gel.

A partir de los estudios inmunológicos, se concluyó que las isoenzimas aisladas tienen determinantes antigénicas muy similares contra anticuerpos preparados en conejo.

Este estudio presentó evidencia sobre la existencia de varias formas catiónicas de la arginasa de hígado de rata, separadas por cromatografía en CM-Celulosa. Los resultados no distinguieron la diferencia entre la presencia de distintas proteínas o un fenómeno de interconversión entre las tres formas

moleculares principales. En un estudio anterior se reportaron dos formas moleculares de esta enzima, las cuales fueron separadas por cromatografía en DEAE celulosa. A partir de los homogeneizados crudos, se observaron dos bandas de actividad en electrofóresis; una migró hacia el cátodo y la otra hacia el ánodo (65).

Por otra parte, se ha reportado que la arginasa de hígado de rata es homogénea (53,59,60). El hecho de que otros investigadores (53,60) no reportaran los picos menores de actividad, puede ser debido a que Tarrab et al (65), utilizaron una alta concentración de proteína, lo que permitió visualizar las actividades de arginasa relativamente menores, o quizá fué debido a las diferencias en los animales y metodología utilizados.

Se ha reportado que la arginasa de hígado de rata se encuentra distribuída entre las partículas celulares como el núcleo, microsomas y mitocondria (58). Para liberar mayor cantidad de enzima, se requiere una fuerza iónica mayor. Esta observación puede explicar el que Farron (2) haya obtenido un solo pico de actividad para la arginasa de hígado de rata. Se puede asumir que la extracción con agua a la manera de Farron, permitió obtener preferencialmente un tipo de arginasa o solo suficiente enzima para permitir la visualización de la forma con la concentración mayor.

El significado de la presencia de diferentes formas moleculares de arginasa en el hígado de rata no se conoce totalmente. Sin embargo, se ha sugerido que las múltiples formas contribuyen

a ventajas significativas, las cuales han sido seleccionadas durante la evolución. Se han realizado varios estudios en relación al control genético y ontogénesis de las isoenzimas. La evidencia acumulativa indica que las isoenzimas son utilizadas para la dirección de metabolitos a lo largo de rutas metabólicas específicas (65). Las isoenzimas también pueden tener una determinada función catalítica conferida a una estructura o compartimento celular. Desde su descubrimiento, estas moléculas han sido relacionadas con la diferenciación de tejido. Por otra parte, se puede considerar la posibilidad de que algunas isoenzimas sean proteínas vestigiales, remanentes de la evolución genética.

Efecto de la dieta proteínica y de la inanición.

Schimke (64) estudió los mecanismos que alteran la síntesis de urea, en respuesta a las diferencias en el consumo de proteína. La adaptación a la variación de los niveles de proteína en la dieta de las ratas, está relacionada con los cambios en los niveles de actividades enzimáticas, así como con las diferencias en el tamaño y contenido de proteína del hígado (Tabla 26).

1.- En este estudio se determinaron los efectos de la variación del consumo de proteína en la dieta, sobre las actividades enzimáticas de las rutas asociadas directamente con el metabolismo de aminoácidos. Se encontró que el contenido total de todas las enzimas del ciclo de la urea fué directamente proporcional al consumo diario de proteína (Tabla 27).

Tabla 25. Efectos de la dieta proteínica en el peso corporal, peso hepático, contenido de proteína en el hígado y en la excreción de urea. (64)

	15%		30%		60%	
	A	B	A	B	A	B
-Peso del cuerpo (g)	61 ± 2	105 ± 4	69 ± 3	226 ± 5	90 ± 3	209 ± 7
-Peso del hígado (g)	2.91 ± 0.42	8.30 ± 0.85	4.25 ± 0.43	9.25 ± 0.60	5.2 ± 0.38	9.7 ± 0.55
-Proteína del hígado (mg/g)	204 ± 5	211 ± 3	209 ± 4	220 ± 5	228 ± 6	229 ± 5
-Consumo de dieta (g/día)	14.2 ± 0.9	13.3 ± 1.1	8.3 ± 0.8	15.8 ± 0.9	12.5 ± 1.2	14.3 ± 0.7
-Ingestión de proteína (g/día)	1.90	1.80	2.5	4.8	7.5	8.5
-Excreción de urea (g/día)		0.78 ± 0.12		1.62 ± 0.21		3.81 ± 0.34
-Excreción de urea/Ingestión de proteína		0.43 ± 0.10		0.34 ± 0.15		0.45 ± 0.18

Los grupos de ratas con pesos iniciales de 30 a 60 g (grupo A) y de 140 a 150 g cada una (grupo B), crecieron durante 14 días con dietas conteniendo 15, 30 y 60 % de caseína. Cada valor representa el promedio de 8 animales ± error estándar.

Una relación similar se encontró para las transaminasas alanina-glutámica y aspártico-glutámica (asociadas con la conversión de aminoácidos a cetoácidos). Las deshidrogenasas láctica y glucosa 6 fosfato demostraron patrones de cambio diferentes, mientras que las deshidrogenasas málica y glutámica no fueron afectadas por los cambios en la dieta de proteína.

Tabla 27. Efectos de la dieta proteínica en los niveles de las enzimas del ciclo de la urea en el hígado de rata. (64)

Enzima	15 %		30 %		60 %	
	A	B	A	B	A	B
	moles	moles	moles	moles	moles	moles
-Carbamil fosfato sintetasa	828 ± 18	520 ± 27	849 ± 20	864 ± 24	2186 ± 30	1428 ± 28
-Ornitina carbamil transferasa	18200 ± 240	11680 ± 200	18500 ± 260	23200 ± 289	56000 ± 520	38200 ± 650
-Arginino succinato sintetasa		121 ± 12		207 ± 20		324 ± 21
-Arginino succinato liasa	426 ± 10	270 ± 8	525 ± 6	492 ± 8	1250 ± 8	911 ± 6
-Arginasa	38300 ± 1500	29700 ± 1300	40400 ± 900	37800 ± 1200	84500 ± 1600	50600 ± 1800

Los grupos de ratas con pesos iniciales de 50 a 60 g (grupo A) y de 140 a 150 g cada una (grupo B), crecieron durante 14 días con dietas conteniendo 15, 30 y 60 % de caseína. Cada valor representa el promedio de 6 animales ± error estándar. Las actividades enzimáticas son expresadas como micromoles de producto formado por g de peso húmedo de hígado a 37°C. Los valores para las actividades de argininosuccinato sintetasa están basados en una serie separada de ratas pesando de 140 g a 150 g al inicio del período experimental.

2.- Después de un aumento agudo en la concentración de proteína en la dieta, los cambios en los niveles de las enzimas del ciclo de la urea fueron completados en un plazo de 4 a 14 días. Las disminuciones agudas en la dieta de proteína, dieron como resultado, una disminución neta en el contenido

enzimático que fué máxima hasta después de 8 días.

3.- La purificación y caracterización de la arginasa y de la ornitina carbamil transferasa a partir de hígados de rata con diferentes actividades, no revelaron diferencias en las propiedades de pH óptimo, valores de K_m , coeficientes de temperatura, pesos moleculares o números de recambio. Se concluyó, por lo tanto, que las diferencias observadas en las actividades enzimáticas son debidas a la variación en el contenido de proteína específica más que un efecto de los activadores, inhibidores, o una alteración en las propiedades cinéticas de las moléculas de enzima.

4.- A partir de los resultados, se sugirió que las alteraciones provocadas por el contenido de proteína en la dieta, representan un ejemplo de adaptación en los mamíferos, el cual involucra la síntesis y la degradación de la enzima proteínica específica.

Más tarde, Schimke (60) estudió los efectos de la inanición y el mantenimiento de una dieta libre de proteína sobre los niveles hepáticos de las enzimas involucradas en la síntesis de urea. Aunque ambas condiciones están asociadas con la no ingestión de proteína y con una gran pérdida de la proteína total del hígado, así como con otros constituyentes de los tejidos, los efectos en la excreción de urea fueron dramáticamente opuestos. Así, durante un ayuno prolongado, la energía es derivada a partir de la proteína corporal y ocurre un aumento en la excreción de urea. Por otra parte, en una dieta libre de

proteína, los requerimientos de energía son obtenidos a partir de las grasas y carbohidratos. Bajo estas condiciones, la excreción de urea disminuye.

Durante el séptimo día experimental, ambas condiciones (la inanición y la dieta libre de proteína), dieron como resultado una pérdida grande de la proteína total del hígado. Sin embargo, durante la inanición, la excreción de urea aumentó 5 veces sobre el valor de los animales que fueron mantenidos en una dieta con 15 % de proteína; mientras que la dieta libre de proteína produjo una disminución de 25 % en la excreción de urea, con respecto a los controles. Los niveles de las enzimas del ciclo de la urea están relacionados con el rango de excreción de urea más que con el contenido de proteína en el hígado.

La inanición está asociada con una elevación neta de 120 a 300 % en la actividad de cada una de las enzimas del ciclo de la urea, con respecto a las actividades presentes al inicio del ayuno. Las dietas libres de proteína producen una disminución en los niveles enzimáticos, que no son más grandes que la pérdida de la proteína total del hígado.

Estos efectos diferenciales de dos formas de agotamiento de proteína indican la presencia de mecanismos de control para enzimas específicas en el hígado de rata. De acuerdo con esto, se sugirió que las variaciones en la excreción de urea pueden ser medidas, en gran parte, por alteraciones en los niveles de las enzimas asociadas específicamente con la síntesis de urea.

Dos años mas tarde, Schimke (207) realizó mediciones de la

síntesis y degradación (recambio) de la arginasa de hígado de rata y demostró que los cambios en la velocidad de degradación así como los cambios en la velocidad de síntesis, pueden ser un factor importante en la determinación del nivel de esta enzima. La arginasa es una enzima adecuada para los estudios de síntesis y degradación a partir de cambios enzimáticos, ya que esta aumenta o disminuye "in vivo" en respuesta a un número de factores que aumentan o disminuyen la excreción de urea.

La velocidad de recambio de la arginasa de hígado de rata "in vivo" fué determinada usando técnicas de administración de isótopo. La arginasa se aisló en un estado homogéneo por procedimientos de purificación o por precipitación inmunológica.

Una dieta de aminoácidos conteniendo ^{14}C -L-lisina de radioactividad constante, se administró de manera continua a las ratas durante periodos de más de 28 días. Se encontró un tiempo de vida media de 4 días, a partir de la incorporación de ^{14}C -L-lisina en la arginasa, basada en los primeros 4 días de administración de la marca. Por el día 20 de la administración del isótopo, 91 % de los residuos de lisina en la arginasa aislada fueron reemplazados a partir de la fuente dietética, y 75 % de los residuos de lisina fueron reemplazados a partir de la proteína total del hígado; de tal manera que toda la arginasa y gran parte de la proteína total del hígado, fueron reemplazadas a partir de la fuente exógena. La velocidad de pérdida de isótopo a partir de la arginasa marcada con ^{14}C -guanidino-L-arginina siguió cinéticas de primer orden con un tiempo de vida

media de 4 a 5 días.

Las contribuciones a partir de las alteraciones en las velocidades de degradación de la arginasa, se evaluaron como un mecanismo para la adaptación de la enzima en tejidos animales. Durante la supresión de comida, la degradación de arginasa se detiene, mientras que la síntesis continúa a una velocidad constante, provocando un aumento del doble en el contenido de enzima después de 6 días. En el cambio de una dieta alta en proteína a una dieta baja en proteína, la velocidad de degradación de la enzima aumenta y la velocidad de síntesis disminuye; decreciendo por lo tanto el contenido de enzima.

Efecto de la adrenalectomía.

Aunque la adrenalectomía y el tratamiento con hormona del crecimiento (90) causan una disminución en la excreción de nitrógeno y ambas disminuyen la actividad de arginasa en el hígado de rata, los cambios en el patrón metabólico general son absolutamente diferentes. En las ratas con adrenalectomía, la disminución en la excreción de urea está relacionada con una disminución en la gluconeogénesis a partir de la proteína, y en ratas tratadas con hormona del crecimiento, está relacionada con una acumulación de proteína (91).

La reacción limitante de la velocidad del ciclo de la urea en el hígado de rata, es la enzima condensante del sistema arginina sintetasa; la argininosuccinato sintetasa. La actividad de esta enzima es importante, ya que a través de las reacciones limitantes de la velocidad es como se ejerce el control metabó-

lico. La actividad de argininosuccinato sintetasa disminuye en el hígado de ratas con adrenalectomía, y un aumento grande ocurre en ratas tratadas con hidrocortisona y en ratas diabéticas o hipertiroideas (92).

Mc Lean et al (89), efectuaron mediciones de las 5 enzimas del ciclo de la urea con el objeto de determinar si la adaptación metabólica a la disminución en la excreción de urea, involucra específicamente la reacción de velocidad limitante (la manera más económica de disminuir la producción de urea), o si la actividad de todas las enzimas del ciclo de la urea cambia.

La adrenalectomía causó una reducción en la actividad de las 5 enzimas del ciclo de la urea y de la deshidrogenasa glutámica. Los cambios más notables ocurrieron en la actividad de la argininosuccinato sintetasa y en la arginasa de hígado; ambas cayeron a casi 40 % de los valores de los controles (Tabla 28).

El tratamiento con acetato de cortisona, causó un aumento en las actividades de argininosuccinato sintetasa, argininosuccinato liasa y arginasa (localizadas en la fracción soluble de la célula), con respecto al valor control. En ratas con adrenalectomía, el acetato de cortisona restauró las actividades de éstas enzimas hacia el valor normal; la arginasa mostró la respuesta más rápida.

Tabla 28. Efecto de la adrenalectomía sobre las actividades de las enzimas del ciclo de la urea en el hígado de rata. (89)

	No. de animales	Grupo control	Grupo con adrenalectomía	P
-Peso corporal inicial (g)		114 ± 5	114 ± 5	---
-Peso corporal final (g)	10	148 ± 4	149 ± 5	---
-Peso del hígado (g)		7.53 ± 0.4	6.81 ± 0.28	---
-Carbamil fosfato sintetasa:				
Act. total	9	318 ± 15	234 ± 22	0.003
Act. específica		1554 ± 85	1064 ± 33	< 0.001
-Ornitina carbamil transferasa:				
Act. total	10	12410 ± 650	9550 ± 900	0.022
Act. específica		62100 ± 2460	43310 ± 4460	0.003
-Peso corporal inicial (g)		150 ± 7	140 ± 6	---
-Peso corporal final (g)	6	157 ± 12	150 ± 7	---
-Peso del hígado (g)		7.37 ± 0.69	6.88 ± 0.35	---
-Argininosuccinato sintetasa:				
Act. total	6	88 ± 3	38 ± 3	< 0.001
Act. específica		413 ± 19	176 ± 13	< 0.001
-Argininosuccinato liasa:				
Act. total	6	207 ± 16	142 ± 12	0.011
Act. específica		965 ± 67	651 ± 58	0.006
-Arginasa:				
Act. total	6	127000 ± 4000	46500 ± 5300	< 0.001
Act. específica		594000 ± 28000	213000 ± 23000	0.002

Los resultados representan la media ± E.E.M. (error estándar de la media). Una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de urea/h/g de tejido. La actividad específica esta expresada como unidades totales/100 g de peso corporal. ---: no determinado.

El cambio más notable en los animales tratados con hormona del crecimiento, fué la reducción en la actividad de la argininosuccinato sintetasa.

Todas las condiciones estudiadas que conducen a la hidrólisis de proteína y al aumento resultante en la excreción de urea, ya sea una dieta rica en proteína, la inanición o la administración de corticoesteroide, están asociadas con aumentos en las actividades de todas las enzimas del ciclo de la urea. Por otro lado, se ha demostrado que las glándulas adrenales intactas no son necesarias para el aumento en los niveles de las enzimas, producidos por una dieta alta en proteínas (90).

La administración de aminoácidos individuales, urea o algún sustrato específico del ciclo de la urea (ornitina, citrulina o arginina), no produjo ninguna alteración en los niveles de las enzimas del ciclo de la urea.

Las concentraciones intracelulares, en el estado de equilibrio de arginina, citrulina y ornitina fueron constantes bajo las condiciones que conducen a alteraciones en la excreción de urea y en los niveles enzimáticos.

Se encontraron dos condiciones en las cuales la actividad de arginasa no cambia en un patrón similar a los cambios en las otras cuatro enzimas, indicando que el nivel de ésta enzima es controlado en una manera diferente (90): (a) la adrenalectomía resulta en una disminución de 70 a 80 % en la actividad específica de arginasa, mientras que la disminución en las otras cuatro enzimas es a lo mucho de 30 %; (b) cuando las ratas se

alimentan con una dieta libre de arginina, las actividades específicas de las cuatro enzimas involucradas en la biosíntesis de arginina aumentan 2 veces por arriba de los niveles basales, predichos sobre las bases de excreción de urea; mientras que la actividad de arginasa no se modifica.

La administración simultánea de L-etionina, eliminó el aumento en los niveles de actividad de ornitina carbamil transferasa y de arginasa producidos por la administración de acetato de cortisona.

Efecto del zinc en la dieta.

Varias investigaciones han indicado que se presentan defectos en los sistemas enzimáticos del ciclo de la urea debido a una dieta deficiente en zinc (93,94).

En ratas, una dieta deficiente en zinc administrada a lo largo de 2 a 3 semanas, produjo un aumento en la actividad de arginasa y un aumento en la excreción de urea y ácido úrico en la orina (94). Por otra parte, en cerdos, no se observó cambio en las actividades de arginasa o glutamato deshidrogenasa, después de ser alimentados durante 6 semanas con una dieta deficiente en zinc (36).

Rabbani et al (185), encontraron que en ratas deficientes en zinc, la concentración de urea en sangre declinó drásticamente durante la cuarta semana experimental. Esto parece indicar que el tiempo de duración de la deficiencia de zinc, afecta la actividad de arginasa y glutamato deshidrogenasa.

Rahmatullah et al (36), observaron un aumento en la actividad de glutamato deshidrogenasa y ningún cambio en la actividad de arginasa en ratas alimentadas con una dieta deficiente en zinc durante 15 semanas. Las discrepancias entre los resultados de estos investigadores y los anteriores (94), pueden ser debidas a la diferencia en el grado de duración de la deficiencia de zinc, ya que la concentración de urea en sangre empieza a declinar de manera pronunciada y significativa en la cuarta semana del régimen diético.

Las ratas después de ser alimentadas con una dieta deficiente en zinc durante dos semanas, empiezan a desarrollar síntomas de deficiencia en el desarrollo. Estos síntomas se caracterizan por retardo en el crecimiento, pérdida de pelo, lesiones dérmicas y fisuras en las comisuras de la boca.

La deficiencia de zinc no tuvo efecto sobre el peso del tejido. Por otra parte, las ratas deficientes, mostraron actividad baja de ornitina carbamil transferasa y de glutamatodeshidrogenasa (95). Los resultados apoyan la sugerencia de Rabbani et al (93), de que la utilización de amoníaco es defectuosa en ratas deficientes en zinc, dando como resultado su elevación en el plasma. Estos investigadores también notaron una disminución en la actividad de ornitina carbamil transferasa pero no midieron la actividad de glutamato deshidrogenasa.

Regulación hormonal.

Mimic-Oka et al (145), estudiaron la función de la glándula adrenal en la regulación de la actividad de la arginasa renal y determinaron el nivel de sensibilidad de ésta enzima a la hidrocortisona en comparación con la arginasa hepática (Tabla 29).

Tabla 29. Efecto de la hidrocortisona sobre el contenido de arginasa renal y hepática en ratas. (145)

Condiciones	No. de animales	Actividad de arginasa	Incremento	Significancia
		unidades	(t)	
Riñón:				
Controles	7	9.68 ± 1.56	---	---
Tratamiento con hidrocortisona:				
-5 mg/100 g de peso corporal	7	19.41 ± 2.67	+100.3	< 0.001 -10
mg/100 g de peso corporal	7	24.48 ± 4.20	+152.9	< 0.001 -25
mg/100 g de peso corporal	7	31.44 ± 2.37	+224.8	< 0.001
Hígado:				
Controles	7	308.7 ± 41.4	---	---
Tratamiento con hidrocortisona:				
-5 mg/100 g de peso corporal	7	361.0 ± 60.0	+ 11.7	> 0.05 -10
mg/100 g de peso corporal	7	356.0 ± 41.3	+ 15.3	> 0.05 -25
mg/100 g de peso corporal	7	795.9 ± 10.9	+157.8	< 0.001

Los datos de actividad representan la media ± D.E. (desviación estándar). Una unidad de arginasa es la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de urea en 1 min a 38°C, pH 8.6.

El efecto de la administración de hidrocortisona en la actividad de arginasa depende de la dosis empleada. Dosis pequeñas de hidrocortisona tienen un efecto débil sobre la actividad de arginasa en el hígado, mientras que altas dosis de hidrocortisona cambian significativamente la actividad de ésta enzima. En éste estudio también se demostró que la adrenalectomía produce una disminución de la actividad de arginasa en el hígado.

La arginasa renal es mucho más sensible al efecto de la hidrocortisona exógena. Al aumentar la dosis de hidrocortisona ocurre un aumento proporcional en la actividad de arginasa en los riñones. La adrenalectomía, sin embargo, no cambia la actividad enzimática en el riñón. El efecto de la hidrocortisona exógena en la arginasa renal fué el mismo en ratas adrenalectomizadas y en ratas intactas. Estos resultados pueden ser fundamentales para postular que la actividad de arginasa en el riñón es regulada de una manera diferente a la actividad en el hígado.

Greengard et al (132), demostraron que la acumulación de arginasa en el hígado de rata ocurre en dos pasos distintos; durante el período fetal tardío (últimos días de la gestación) y durante la tercera semana postnatal.

Una inyección de tiroxina (pero no de hidrocortisona), resaltó la acumulación prenatal de arginasa. La inyección de hidrocortisona (pero no de tiroxina) en ratas de 5 a 8 días de edad, ocasionó que el nivel de arginasa hepática aumentara a los niveles presentes en el hígado de rata adulta en solo 24 h. La

adrenalectomía en ratas de 12 días de edad, inhibió la acumulación natural de arginasa. Los resultados sugieren que las hormonas tiroidea y glucocorticoide promueven sucesivamente la formación de arginasa durante los periodos fetal tardío y lactante, respectivamente.

Husson et al (137), han reportado que las actividades de arginino succinato sintetasa, arginino succinato liasa y arginasa aumentan con regularidad en el hígado de ratas fetales, entre los 17.5 días de la preñez y el nacimiento. Con la excepción de argininosuccinato liasa, todas las enzimas del ciclo de la urea son afectadas por la supresión de glucocorticoesteroide durante el período fetal tardío (18 días de preñez). Al administrar cortisol (hidrocortisona) a los fetos carentes de corticoesteroide, las actividades de argininosuccinato sintetasa y arginasa aumentan. La actividad de argininosuccinato liasa parece responder a la hormona solo después del nacimiento (184).

En una investigación posterior, Husson et al (180) demostraron que las actividades de argininosuccinato sintetasa, argininosuccinato liasa y arginasa aumentan en las ratas recién nacidas. Los nacimientos prematuro y postmaduro ocasionan un cambio en el patrón de desarrollo de éstas actividades, lo cual sugiere que el aumento observado en la actividad de las tres enzimas, es iniciado por el proceso del nacimiento.

La inanición en las ratas recién nacidas no tuvo efecto sobre el desarrollo postnatal de las actividades de argininosuccinato sintetasa, argininosuccinato liasa y arginasa.

La adrenalectomía bilateral en el nacimiento causa una inhibición parcial del aumento postnatal de las actividades de argininosuccinato liasa y arginasa mientras una inyección de cortisol previene estos efectos de la adrenalectomía. Los resultados sugieren que la secreción adrenal es una condición necesaria para el aumento de la actividad enzimática de las ratas prematuras.

Snodgrass et al (124) demostraron que cuando a las ratas se les administra glucagon en dosis farmacológicas (4 mg/kg/día) ocurre un aumento en las actividades de las cinco enzimas del ciclo de la urea. Las relaciones máximas de actividades enzimáticas (unidades/hígado por 100 g de rata) sobre los controles fueron: 2.0 para carbamil fosfato sintetasa, 1.3 para ornitina carbamil transferasa, 2.7 para argininosuccinato sintetasa, 3.2 para argininosuccinato liasa y 2.2 para arginasa. La actinomicina D o puromicina previnieron los efectos del glucagon.

El aumento de la actividad de arginasa después del tratamiento con zinc-glucagon es igualado por un aumento en la enzima inmunoprecipitable.

La alimentación de las ratas durante dos días con hidrolizado de caseína, ocasiona un aumento en las actividades de las cinco enzimas de 1.5 a 2.2 veces y produce niveles de glucagón en plasma similares a los requeridos para la inducción enzimática por glucagon exógeno. Esto demuestra que cuando la alimentación incluye proteína, el glucagon es un inductor de las actividades enzimáticas del ciclo de la urea.

Sin embargo, estos experimentos no indican si el glucagon actúa como un inductor enzimático por su efecto directo sobre las células del hígado o si actúa por efectos indirectos como la liberación de otras hormonas, o cambios en los niveles de aminoácidos o ácidos grasos en el plasma.

Gebhardt et al (117), cultivaron células del parenquima de hígado de rata adulto en monocapas perfundidas. Los niveles de las enzimas del ciclo de la urea aumentan entre 15 % y 60 % en respuesta al glucagon (10 μ M) en 24 h. La estimulación es drásticamente resaltada por la presencia simultánea de dexametasona (10 μ M), especialmente en el caso de argininosuccinato sintetasa y argininosuccinato liasa, las cuales aumentan cerca de 3 veces.

La dexametasona (sin la presencia de glucagon) produce una estimulación despreciable pero ejerce un efecto similar al del glucagon cuando se administra 6 h antes del tratamiento con el mismo.

El efecto del glucagon, particularmente en presencia de dexametasona es imitado por (bu) AMPc (dibutiril adenosina 3':5'-monofosfato) mientras que la epinefrina no tiene efecto. La ciclohexamida elimina todas las estimulaciones inducidas por las hormonas o por (bu) AMPc, sugiriendo la implicación de síntesis de proteína en el proceso de inducción.

En un estudio posterior, Lin et al (32) llevaron a cabo experimentos para demostrar: 1) si el glucagon solo, puede aumentar las actividades de las cinco enzimas del ciclo de la urea en

cultivos de monocapas de hepatocitos de rata; 2) si el glucagon es efectivo en concentraciones fisiológicas; 3) si otras hormonas como los corticoesteroides o insulina juegan una función permisiva o antagonista con el glucagon; 4) si el AMPc es el segundo mensajero del glucagon en el proceso de inducción; y 5) si el glucagon aumenta las actividades "in vitro" por inducción enzimática.

Al cultivar las células con dexametasona $10 \mu\text{M}$ y con glucagón $10 \mu\text{M}$, se observó un aumento en las actividades de las cinco enzimas del ciclo de la urea. Los aumentos sobre los valores de los controles fueron los siguientes: carbamil fosfato sintetasa, 1.5 veces; ornitina carbamil transferasa, 1.2 veces; argininosuccinato sintetasa, 1.9 veces; argininosuccinato liasa, 1.8 veces y arginasa, 1.7 veces.

La dexametasona (sin la presencia de glucagon) produce un aumento de 1.2 veces en las actividades de argininosuccinato sinteasa y argininosuccinato liasa.

El uso de (bu) AMPc $10 \mu\text{M}$, ocasiona un aumento en la actividad de argininosuccinato sintetasa únicamente, pero cuando éste se combina con dexametasona $10 \mu\text{M}$, se activan las cinco enzimas. La combinación del corticoesteroide con el (bu) AMPc, causa un efecto sinérgico en la inducción de las actividades del sistema arginina sintetasa (32).

La inducción por glucagon con o sin dexametasona, no es afectada por la insulina. Otras hormonas tales como la epinefrina, pentagastrina, secretina, colecistoquinina octapeptido, di-

metil prostaglandina E2, triiodotironina, estradiol y la hormona del crecimiento, no afectan las actividades enzimáticas ya sea que éstas se utilicen solas o en combinación con glucagon o dexametasona. Así, el glucagon, apoyado en una función permisiva por los glucocorticoesteroides, es el único inductor hormonal identificado de las cinco enzimas del ciclo de la urea, en células de hígado de rata (32,89,92).

El glucagon puede aumentar las actividades de las cinco enzimas del ciclo de la urea en hepatocitos cultivados, si éste se encuentra presente en una concentración suficientemente alta durante un período de tiempo prolongado (32,117). A concentraciones fisiológicas (10 μ M), el glucagon (sin la presencia de dexametasona), solo activa a la argininosuccinato sintetasa (32). La dexametasona parece facilitar el potencial del glucagon para la inducción de las otras actividades enzimáticas. Esto es un verdadero efecto permisivo.

El mecanismo por el cual la dexametasona aumenta el potencial de la inducción enzimática a través del AMPc o el glucagon, es desconocido (32).

Un descubrimiento novedoso es la evidencia de que un aumento en la enzima proteica, no solo en la actividad, resulta a partir de los efectos combinados del glucagon y de la dexametasona en los casos de argininosuccinato liasa y arginasa. Las inmunotitulaciones indican que los incrementos producidos por éstas hormonas en unidades de actividad enzimática, son debidos a incrementos iguales en las enzimas inmunoprecipitables. Aún

está por demostrarse si ésto es válido para las otras tres enzimas del ciclo de la urea.

Husson et al (184) estudiaron si el glucagon o el $(bu)_2$ AMPc pueden inducir la aparición prematura de las últimas tres actividades enzimáticas del ciclo de la urea, con o sin la acción concomitante de los glucocorticoesteroides (cortisol). Estos investigadores determinaron los efectos "in vivo" de los glucocorticoesteroides y del glucagon en la síntesis de argininosuccinato sintetasa, argininosuccinato liasa y arginasa durante el período fetal tardío.

La administración exógena de glucagon causa un aumento en las actividades de argininosuccinato liasa y arginasa en los hígados de ratas fetales a término pero no a estados tempranos. El glucagon produce un aumento temprano en la actividad de argininosuccinato liasa, en los fetos tratados previamente con cortisol.

Cuando los fetos se privan de corticoesteroide (hipofisectomía in utero), el glucagon no promueve la actividad de argininosuccinato liasa, indicando que se requieren los glucocorticoesteroides para resaltar la actividad enzimática por glucagón. El $(bu)_2$ AMPc es capaz de aumentar las actividades enzimáticas hasta en los fetos con hipofisectomía.

Los resultados obtenidos al inyectar inductores combinados indican que la interacción glucocorticoesteroide-glucagon puede estar involucrada en la regulación de argininosuccinato sintetasa y argininosuccinato liasa. No se encontró acción sinérgica

de éstas hormonas para la regulación de la actividad de arginasa "in vivo" (184).

En otro estudio, Haggerty et al (143), caracterizaron la regulación por glucocorticoides de los niveles de arginasa y argininosuccinato sintetasa en dos líneas de hepatoma de rata, H -11-E-C y MH C ; éstas líneas celulares contienen actividades de arginasa y argininosuccinato sintetasa a niveles constitutivos bajos.

La hidrocortisona eleva la actividad de ambas enzimas en función del tiempo de exposición y de la dosis de hormona. Este efecto se presenta aún en pequeñas cantidades de etanol (0.1-0.9 % v/v) y es bloqueado por un exceso del esteroide "anti-inductor", fluoximesterona. Otros inductores tales como dexametasona y corticosterona, son tan efectivos como la hidrocortisona para elevar los niveles de arginasa y argininosuccinato sintetasa a concentraciones saturantes. La inhibición de estas estimulaciones por ciclohexamida, indica que la síntesis progresiva de proteína celular es requerida para la estimulación hormonal de ambas enzimas.

Los resultados anteriores corroboran los estudios realizados en el animal completo y permiten obtener la conclusión de que la estimulación de las enzimas del ciclo de la urea por hidrocortisona en las células de hepatoma, es mediada por un mecanismo clásico de glucocorticoides que involucra la unión inicial a receptores esteroideos específicos y la acumulación eventual de nuevas moléculas de enzima.

Traniello et al (189), han demostrado que la difusión de cortisol o insulina en el hígado aislado de gallina, no afecta la actividad catalítica de arginasa, en contraste con el efecto que éstas dos hormonas tienen "in vivo". Esto apoya el punto de vista de que el efecto de las hormonas (insulina o cortisol) "in vivo" es mediado y que no es directo sobre las células del hígado.

La ciclohexamida suprime la estimulación "in vivo" del cortisol e insulina; ésto demuestra que la síntesis de proteína está involucrada en un proceso ya sea a nivel de un efector intermedio o a nivel de una arginasa "ureotética" sintetizada de novo.

La difusión heteróloga de eritrocitos de vaca en la gallina, ocasiona un aumento en la actividad catalítica de la arginasa en el hígado de la misma y su Km para arginina decrece. Estas propiedades son características de la aparición de una enzima ureotética (122).

Freeman et al (21), han demostrado que es posible inducir la actividad de arginasa en el útero de rata por administración de 17 -estradiol (2 y 8 g) durante 7 días. El peso uterino, proteína total y actividad específica de arginasa aumentaron con ambas dosis de estradiol. Sin embargo, los aumentos más grandes en el contenido de proteína total y actividad de arginasa se observaron con la dosis de 2 g. Con estos resultados, se demuestra que los estrógenos participan en la regulación de la actividad de arginasa uterina.

Yamanaka et al (197), han demostrado que los androgenos influyen en las actividades de arginasa del riñón y de la próstata ventral en ratas.

La castración ocasionó una disminución marcada de la actividad de arginasa en el precipitado de la próstata ventral, mientras que el cambio de la actividad en el sobrenadante fué totalmente moderado. Por otra parte, no se observaron cambios importantes de la actividad enzimática en ambos sobrenadante y precipitado del riñón. El tratamiento con testosterona a las ratas castradas ocasiono un aumento en la actividad enzimática en el precipitado del riñón y de la próstata ventral; y la elevación de la actividad de arginasa en el sobrenadante fué seguida por un aumento de la actividad en el precipitado. El aumento en la actividad enzimática de la próstata ventral fué más rapido que en el riñón, después de la administración de testosterona.

Es interesante notar que el crecimiento prostático evocado por la administración de testosterona, es acompañado por la elevación de la actividad de arginasa en el mismo tejido.

En un estudio posterior, Yamanaka et al (196) demostraron que los estrogenos influyen en la actividad de arginasa en la próstata de rata adulto.

La administración de benzoato de estradiol (5 o 500 g durante 7 días) causó un aumento en la actividad de arginasa de la próstata dorsolateral, en contraste con la disminución de la actividad enzimática observada para la próstata ventral.

Ontogénesis de arginasa.

En 1980, Lamers et al (182) realizaron estudios sobre el perfil de desarrollo para dos de las enzimas del ciclo de la urea, la carbamil fosfato sintetasa y la arginasa.

Estos autores estimaron las relaciones de respuesta a la dosis entre una hormona glucocorticoesteroide sintética, la prednisolona y las actividades de carbamil fosfato sintetasa y arginasa. El contenido de DNA fué estimado para correlacionar los cambios en las actividades enzimáticas con los cambios en el tamaño y número de células.

También, en un período sensible a la prednisolona, por ejemplo la segunda semana postnatal, la potencia de la prednisolona se comparó con tres hormonas glucocorticoesteroides comunmente usadas: dexametasona, triamcinolona e hidrocortisona.

En ratas, las actividades hepáticas de carbamil fosfato sintetasa y arginasa están estrechamente relacionadas durante el desarrollo. Las actividades de éstas dos enzimas aumentan drásticamente durante los últimos 4 días prenatales y los primeros 4 días postnatales, así como en la tercera semana postnatal. Se observan disminuciones en las actividades entre los días 4 y 9 días posteriores al nacimiento y después del destete, durante la adolescencia. Durante la senectud, las actividades aumentan de nuevo.

Antes del nacimiento, el tratamiento con prednisolona no aumenta las actividades enzimáticas como lo hace durante las primeras 2 semanas postnatales, cuando parece precipitarse el

desarrollo normal de la tercera semana postnatal. En la cuarta semana postnatal, la sensibilidad al tratamiento con prednisolona aumenta aproximadamente 25 veces. Durante la segunda semana postnatal, la dexametasona prueba ser más potente, en concentración molar, que la triamcinolona, la cual a su vez es más potente que la prednisolona e hidrocortisona.

Los aumentos en las actividades enzimáticas que están asociados con los incrementos en los niveles de glucocorticosteroides en sangre, están también asociados con disminuciones de 2 a 3 veces en el contenido de DNA, por ejemplo con disminuciones en la multiplicación de hepatocitos y aumentos en el tamaño celular del hepatocito.

Algunas de las razones por las cuales la administración diaria de hormonas glucocorticoesteroides produce solo una estimulación débil de las actividades de carbamil fosfato sintetasa y arginasa en el período prenatal comparado con el período postnatal, pueden ser el alto rango de acumulación enzimática antes del nacimiento, junto con un alto nivel endógeno de hormona corticoesterona circulante y una falta relativa de moléculas receptoras de glucocorticoesteroides en los hepatocitos.

Lamers et al (183) en un estudio posterior, evaluaron la función de la hormona tiroidea en el aumento dirigido por la hormona glucocorticoesteroide (prednisolona) en las actividades de carbamil fosfato sintetasa y arginasa en los períodos prenatal y postnatal inmediato de la rata.

La administración de hormonas tiroideas causa un aumento

dependiente de la dosis en las actividades de carbamil fosfato sintetasa y arginasa en el hígado de rata fetal pero no en el hígado de rata neonatal. La administración simultánea de hormonas tiroidea y glucocorticoesteroide (prednisolona) resalta la acumulación enzimática inclusive en el feto. Cuando se administran antes del nacimiento, las potencias relativas de T (3,5,3',5'-L-tetraiodotironina) y T⁻ (3,5'-L-triiodotironina) comparadas con T (3,5,3'-L-triiodotironina) son 20-25 % y 1-2 %, respectivamente. Tanto antes como después del nacimiento, las hormonas tiroideas resaltan el contenido de DNA del hígado.

La hipofisectomía de los fetos causa una reducción de 30 a 40 % en el nivel de la actividad de carbamil fosfato sintetasa en los hepatocitos. Las hormonas tiroidea y glucocorticoesteroide administradas individualmente a los animales con hipofisectomía, estimulan la actividad de enzimática de 2 a 3 veces; y si se administran simultáneamente, de 4 a 6 veces. El tratamiento con hormona tiroidea y/o glucocorticoesteroide iniciado antes del nacimiento, muestra perfiles ininterrumpidos de acumulación enzimática en los hepatocitos.

El retraso del nacimiento por tratamiento con progesterona, conduce a rangos reducidos pero ininterrumpidos de acumulación enzimática en los hepatocitos.

La progesterona inhibe la aparición normal o acelerada (por prednisolona) de las actividades de carbamil fosfato sintetasa y arginasa durante la gestación normal y prolongada. Los

argumentos para un antagonismo competitivo se mencionan a continuación:

- (1) La disminución en los niveles de progesterona circulante durante los últimos 4 días prenatales está acompañada por un aumento en los niveles del glucocorticoesteroide y por la aparición de las enzimas del ciclo de la urea. También en la primera semana postnatal pero no tanto en la segunda, la progesterona inhibe los aumentos inducidos por prednisolona de las actividades de arginasa y carbamil fosfato sintetasa.
- (2) La progesterona retarda la disminución del contenido de DNA inducido por el glucocorticoesteroide durante los 4 días prenatales, pero éste efecto desaparece durante la gestación prolongada y después del nacimiento.

Ambas actividades de carbamil fosfato sintetasa y arginasa aumentan en los fetos durante la gestación prolongada, así como en los neonatos de la misma edad conceptual (182). Durante la gestación prolongada, la morfología y bioquímica del hígado, así como los niveles de glucagon e insulina, cambian en una manera similar como en los animales recién nacidos. Posiblemente la acumulación enzimática es también dependiente sobre la actividad adrenocortical en fetos postmaduros ya que esta glándula es reactivada durante la gestación prolongada (183).

No fué posible prolongar la preñez más allá de 22 días en los fetos tratados con hormona tiroidea. Aparentemente la hormona tiroidea no solo acelera la maduración del hígado, sino también la aparición de funciones incompatibles con la vida

intrauterina. Esto contrasta con los glucocorticoesteroides.

Se ha demostrado que la actividad de carbamil fosfato sintetasa (amoniaco) disminuye durante la adolescencia de la rata y que es menor en la hembra adulta que en el macho adulto (181). La misma tendencia se ha observado para la actividad de arginasa (182), mientras que el contenido de DNA del hígado es mayor en las hembras que en los machos.

Otros investigadores han demostrado que en el último tercio de la preñez, un período en el que los niveles de hormonas esteroides son altos, la actividad de carbamil fosfato sintetasa, pero no de arginasa, disminuye y la proliferación celular del hígado aumenta en las madres (181). Estas observaciones señalan una función posible para las hormonas gonadales en la evolución normal e inducida por hormona glucocorticoesteroide de las actividades de carbamil fosfato sintetasa y arginasa, y en el contenido de DNA.

En 1981, Lamers et al (181), investigaron los efectos de las hormonas sexuales en los cambios del desarrollo de las actividades de carbamil fosfato sintetasa y arginasa, y en los cambios del contenido de DNA. (La prednisolona se usó como hormona glucocorticoesteroide; el estradiol, testosterona y progesterona como hormonas sexuales).

Después del nacimiento, la administración de estradiol causa un aumento en las actividades de carbamil fosfato sintetasa y arginasa, a altas dosis solamente. La progesterona inhibe fuertemente o hasta hace contrarios estos efectos estimulatorios

del estradiol. La administración individual de progesterona no produce efectos en la primera semana postnatal, estimula en la segunda semana y posteriormente tiene un efecto inhibitorio en las actividades enzimáticas. La testosterona apenas afecta las actividades enzimáticas en las primeras 2 semanas postnatales pero éstas decrecen ligeramente a partir de la tercera semana postnatal en adelante. No se observaron diferencias en la respuesta de cada sexo a estos tratamientos hormonales.

Durante los últimos 4 días prenatales y la primera semana postnatal, la progesterona inhibe parcialmente la acumulación enzimática inducida por prednisolona y disminuye el contenido de DNA. La testosterona tuvo efectos semejantes durante las primeras 2 semanas postnatales.

La comparación de estos resultados experimentales con los anteriores (182), demuestra que solo las hormonas esteroides sistemáticamente catabólicas como los glucocorticoesteroides y los estrógenos influyen la estimulación de la actividad enzimática y los perfiles del contenido de DNA, mientras que las hormonas esteroides sistemáticamente anabólicas como la progesterona y testosterona modulan los perfiles, antagonizando (inhibiendo) los efectos de las hormonas catabólicas en el hígado. No se pudo establecer una función para los estrógenos.

Estudios genéticos de la síntesis de arginasa.

Las células del hígado contienen 2 clases de polisomas (o polirribosomas): los polisomas que se encuentran como partículas

libres en el citosol y los polisomas unidos a membranas como el retículo endoplásmico (193,209).

Las proteínas que se sintetizan por los polisomas unidos al retículo endoplásmico son liberadas y expulsadas al citoplasma (proteínas secretoras). Los polisomas libres en el citosol son los responsables de la síntesis de proteínas que se requieren para las funciones intracelulares (proteínas no exportables). Sin embargo, la diferencia funcional entre éstas dos clases de polisomas aún no está bien definida (193).

Tanaka et al (193), estudiaron la síntesis de arginasa en células hepáticas de rata. Estos investigadores incubaron polisomas libres y polisomas unidos a la membrana con ^3H -leucina y ^{14}C -leucina, respectivamente, en un sistema sintetizador de proteína libre de la célula. Las fracciones del sobrenadante se combinaron y la fracción de arginasa se preparó por el método inmunológico, empleando anticuerpo específico contra arginasa purificada de hígado de rata.

Los resultados indicaron que la arginasa en células hepáticas es sintetizada preferencialmente por polisomas libres, ya que éstos son 5 a 10 veces más efectivos en la biosíntesis que los polisomas unidos al retículo endoplásmico.

El análisis genético por medio de la clonación molecular de la secuencia del cDNA para la arginasa puede facilitar los estudios adicionales del efecto de la dieta, de la regulación hormonal, del desarrollo de la expresión del gen de arginasa, y de la deficiencia de la enzima en el hígado y eritrocitos

humanos.

Kawamoto et al (128,151), han aislado y determinado clones de cDNA para la arginasa de hígado de rata. Las especies de mRNA de arginasa de aproximadamente 1,600 bases de largo, se detectaron en el hígado pero no en el intestino delgado, riñón, bazo y corazón de las ratas; ésto indica que el gen que codifica para la arginasa del hígado es distinto de los genes que codifican para la enzima en los tejidos extrahepáticos mencionados.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de la arginasa de hígado de rata con la arginasa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), revela una homología de 40 %. De modo que es probable que las arginasas de hígado de rata y de levadura hayan sido desarrolladas a partir de un gen ancestral común, a pesar de las diferencias en las funciones metabólicas (139).

Los estudios en ratas y en el hombre sano, han demostrado que las especies predominantes de arginasa encontradas en el hígado y en el riñón (A I y A II, respectivamente) son dos proteínas distintas pero cinéticamente idénticas que parecen ser codificadas por genes separados (10,46).

El producto del gen A I, no se encuentra en pacientes con hiperargininemia clínica, mientras que en éstos casos la proteína A II está presente a niveles normales o aumentados (46).

Dizikes et al (106), clonaron el gen de arginasa de hígado de rata y mostraron que existe la hibridización cruzada, aunque a un grado limitado, con el mensaje correspondiente a partir del

hígado humano. Estos mismos autores, separaron una variedad de cDNA de hígado humano mediante hibridización por colonia con cDNA de arginasa de hígado de rata. La ausencia de señal de hibridización con el mRNA de una línea celular expresando solo arginasa de riñón humano, demostró no homología entre los dos genes de arginasa humana e indicó una divergencia evolutiva considerable entre los mismos.

Haraguchi et al (111), más recientemente aislaron cDNAs de arginasa de hígado humano y la secuencia completa de aminoácidos de la enzima a partir de la secuencia de nucleotidos.

La secuencia de aminoácidos de la arginasa de hígado humano, es 87 % y 41 % idéntica a las secuencias de las enzimas de hígado de rata y de levadura, respectivamente (128,151). Hay varios segmentos altamente conservados entre las enzimas humana, de rata y de levadura. Estos resultados sugieren que las arginasas de mamífero y de levadura tienen un origen común.

La cDNA de arginasa de hígado humano podrá facilitar en el futuro, los estudios sobre el análisis molecular, detección del portador y diagnóstico prenatal de la deficiencia de arginasa heredada. Así mismo, la cDNA de arginasa de hígado humano identificada por Dizikes et al (106), será vital para llevar a cabo investigaciones en la evolución de las arginasas, en la naturaleza de las señales reguladoras comunes y dispares que afectan su actividad y en la naturaleza de sus diferencias de expresión específicas de cada tejido.

Arginasa extrahepática.

Isoenzimas (propiedades).

Farron (2) separó las isoenzimas de arginasa de hígado y glándula mamaria de rata por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa. El extracto de glándula mamaria, en un sistema amortiguador a pH 7.2, presenta dos zonas de actividad de arginasa que migran hacia el ánodo durante la electrofóresis. A pH 6.7, la variante con movimiento más lento migra hacia el cátodo. Sólo las isoenzimas de la glándula mamaria fueron afectadas por este incremento en el pH.

A partir de sus resultados, Farron (2) sugirió que las arginasas presentes en los diferentes tejidos de rata, son enzimas proteicas distintas y que por lo tanto deben servir para diversas funciones metabólicas.

Más tarde, Glass y Knox (24) purificaron parcialmente la arginasa de hígado y de glándula mamaria de rata y compararon sus propiedades con la enzima de hígado purificada a una actividad específica de 2,450 unidades/mg de proteína (207).

Los autores reportaron diferencias químicas e inmunológicas entre las arginasas de hígado y glándula mamaria, y algunas observaciones indican cierta similitud de la última enzima con las arginasas de riñón, intestino delgado y ciertos tejidos neoplásicos estudiados.

Las condiciones que permiten la solubilización de la arginasa de hígado, conducen a más de 60 % de la fracción no soluble de la enzima de la glándula mamaria. Como la arginasa de la glándula mamaria tiene una menor conversión al estado soluble, su proceso de purificación difiere del proceso común utilizado para la arginasa de hígado (Tabla 31). La enzima de glándula mamaria probablemente está localizada en la membrana celular, ya que su solubilización requiere de tratamiento con 1-butanol. La arginasa de hígado de rata es estable a 60°C, mientras que la de glándula mamaria es labil a 55°C.

Tabla 30. Purificación de arginasa a partir de glándulas mamarias lactantes de rata. (25)

Paso	Vol.	Act. total	Proteína total	Act. específica	Producción
	mg	unidades	mg	unidades/mg	%
-Homogeneizado	106	2438	2650	0.92	100
-Precipitado lavado	55	1368	790	1.72	56
-Extracto tratado con butanol	74	633	55	11.50	26
-Extracto concentrado	1.5	41	---	---	20
-Sefadex G-150	14.5	38	1.3	29.0	19

7.0 ml del extracto tratado con butanol fueron concentrados. Un 30 % de pérdida de actividad ocurre generalmente durante éste proceso. Picos de actividad combinados 1 y 2. Unidades= 1 μ mol de urea formada/min. La urea liberada se determinó a través del método colorimétrico de Geyer et al (27).

Las actividades de arginasa en el hígado, glándula mamaria, riñón e intestino delgado aumentan similarmente desde pH 7.0 hasta alcanzar el máximo a pH 10. Las preparaciones de hígado retienen las mismas actividades de pH 10 a 10.6 (proteína muy básica), pero las preparaciones de la glándula mamaria son menos activas sobre pH 10.0. A pH 10.6, las preparaciones de glándula mamaria han perdido 75 % de su actividad (proteína neutra o ligeramente ácida). La cromatografía sobre Sefadex G-150 separó solo la actividad de la glándula mamaria en dos fracciones de dfst. pesos moleculares (42,000 y 94,000), ambos menores que el peso molecular de la enzima de hígado (120,000). El anti-suero de conejo que precipita cuantitativamente a las arginasas de hígado de rata adulto y fetal, no reacciona con la enzima de los extractos de glándula mamaria, intestino delgado, riñón, y de un carcinoma renal transplantado (carcinoma renal MK-3, de lento crecimiento). Un tipo de arginasa intermedia encontrada en el hepatoma 7,777 reacciona con el antisuero, pero menos fuertemente que la arginasa de hígado.

La arginasa de glándula mamaria requiere activación similar a la arginasa de hígado de rata (61) pero es menos estable al calor y solo es solubilizada parcialmente por el mismo proceso de purificación. El Mn^{2+} activa a la enzima de la glándula mamaria más que el calor, aunque ambos son requeridos para la actividad máxima (Tabla 31). El tratamiento óptimo fué con Mn^{2+} 10 mM a 50° o 55°C durante 7 1/2 min. A 50°C, la actividad no fué afectada por 30 min, pero a 55 min, ésta decreció con

calentamiento por más de 10 min. Bajo las mismas condiciones, la arginasa de hígado es más resistente. Se hicieron experimentos idénticos con las actividades de arginasa en los homogeneizados de riñón e intestino delgado, las otras dos fuentes importantes de actividad de arginasa en la rata (132). Ambas actividades fueron también lábiles al calentamiento por más de 10 min, aunque un poco menos que los extractos de glándula mamaria. Después de 40 min a 55 min, las actividades fueron 100, 80, 46 y 36 % del máximo para los homogeneizados de hígado, intestino delgado, riñón y glándula mamaria, respectivamente.

Tabla 31. Activación de la arginasa de la glándula mamaria. (25)

Tratamiento		Actividad
Mn	Calentamiento a 55°C	%
-	-	9
-	+	16
+	-	60
+	+	100

25 % de homogeneizado de glándulas mamarías en agua, con una actividad de 59 unidades/g de tejido (= 100 %), se diluyeron con cuarto de volumen de Tris-HCl 0,003 M, pH 7.4 y con MnCl₂ a una concentración final de 30 mM. El tratamiento con calor fué a 55°C durante 7 1/2 min.

No se observaron diferencias cinéticas notables entre la arginasa de hígado y de glándula mamaria. Aunque la Km medida para L-arginina fué mayor en las preparaciones de glándula mamaria que en las de hígado (13 mM), el valor decreció de 110 mM

en el homogeneizado a 45 mM en la preparación purificada 30 veces (último paso, Tabla 30). Las afinidades por los inhibidores, L-ornitina y L- α -aminobutirato, fueron similares para las dos enzimas. Ambas inhibiciones fueron competitivas en tipo, con valores de K_i para la enzima hepática de 5 mM para ornitina, y 8 mM para α -aminobutirato, y de 8 y 12 mM para los mismos dos compuestos con la enzima de glándula mamaria.

Los descubrimientos de esta investigación sugirieron que la arginasa del hígado es un tipo de enzima más especializada. La naturaleza de arginasa en uno de los neoplasmas (carcinoma renal, MK-3), la cual no reacciona con el antisuero de arginasa de hígado, concuerda con este punto de vista. Los tumores generalmente conforman la regla de tener variantes de isoenzima menos especializada (76).

Herzfeld et al (10), demostraron que las reacciones de arginasa en varios tejidos de rata son catalizadas por tres isoenzimas que pueden ser separadas por electroforesis bidireccional sobre geles de poliacrilamida (Tabla 32).

La electroforesis anódica revela una banda de migración (isoenzima I) presente en todos los tejidos extrahepáticos excepto la glándula submaxilar y una banda que no migra encontrada en todos los tejidos. La última es resuelta por electroforesis catódica, en la isoenzima III (característica del hígado y glándula submaxilar) y en una banda sin movimiento (isoenzima II), presente en el riñón, intestino delgado y páncreas (Tabla 32). La electroforesis secuencial de mezclas de

extractos de hígado y riñón en las mismas columnas de gel, separa a las tres isoenzimas.

Las diferencias en las propiedades de solubilización, sensibilidad al calor y especificidad de sustrato de las arginasas de los distintos tejidos, pueden ser relacionadas con su conducta electroforética. En el hígado y glándula submaxilar, las actividades máximas fueron obtenidas por activación a 60°C durante 10 min, mientras que las actividades en los otros tejidos declinaron significativamente durante un tratamiento semejante. Aparentemente el tumor originado del hígado (hepatoma Morris 7,777), ha perdido la propiedad de estabilidad al calor de su tejido proviniente.

Después de la homogeneización (en amortiguador de Mn^{+2} imidazol) y la activación, más de 90 % de la actividad de arginasa del hígado y glándula submaxilar es liberada en la fracción soluble, mientras que sólo hay una liberación de 50-70 % a partir de los otros tejidos (Tabla 32). El pretratamiento de los homogeneizados con Triton X-100 antes de la activación por calor, libera una mayor proporción de enzima en las fracciones solubles.

A partir de los resultados de especificidad de sustrato, se observó que la L-canavanina fué capaz de reemplazar a la arginina como sustrato en los extractos de riñón pero no de hígado. Ambas isoenzimas de riñón hidrolizaron a la L-canavanina, mientras que la isoenzima III de la glándula submaxilar mostró muy poca actividad (Tabla 33).

Tabla 32. Distribución de isoenzimas en los tejidos de rata. (10)

Tejido	Actividad específica (unidades/g)	Activación a 60°C (Ide Act. esp.)	Isoenzimas (%)			Recuperación de los geles (%)
			I	II	III	
Hígado adulto: [10]	2549 ± 368	140 ± 18	0	0	96 ± 0.5	52 ± 17
Hígado fetal: [2]	141	166	0	0	96.5	42
Hepatoma 7,777: [2]	5.7	58				
Glándula sub- maxilar: *						
[10]	124	134	0	0	96.5 ± 1.5	54 ± 4
Riñón: *						
[9]	56.5 ± 7	61 ± 13	58 ± 8	30 ± 5	0	56 ± 4
Intestino delgado: *						
[8]	129 ± 27	61 ± 15	77 ± 1	18 ± 2	0	53 ± 15
Páncreas: *						
[8]	105 ± 12	45 ± 12	46 ± 8	41 ± 10	0	50 ± 14
Epidídimo [2]	129		48.5	39	0	46
Glándula mama- ria lactante: [2]	163		56	32	0	47.5

Los números entre paréntesis indican el número de animales usados. Los homogeneizados fueron calentados a 60°C durante 10 min. La actividad específica fué determinada a partir de los homogeneizados. Los valores para las isoenzimas son expresados como porcentaje de la actividad total recuperada y ensayada a partir de los sobrenadantes. La isoenzima I está en el área de mayor movimiento anódico de actividad de arginasa.

*preparaciones de sobrenadantes tratados con Tritón X-100.

Las velocidades relativas de hidrólisis de L-arginina y L-canavanina a través de las dos isoenzimas de riñón, no fueron significativamente diferentes, lo cual indica que las variables separadas electroforéticamente pueden ser catalíticamente similares. Por consiguiente, no se puede excluir la posibilidad de que la segunda banda de actividad sin movimiento en la mayoría de los tejidos extrahepáticos, pueda resultar a el tratamiento con Triton X-100, las variaciones de la temperatura o tiempo de electrofóresis y las alteraciones leves en el pH de las soluciones usadas, no modifican la distribución de las isoenzimas I, II y III postuladas en los tejidos analizados.

Tabla 33. Especificidad de sustrato de las isoenzimas de arginasa aisladas por electrofóresis anódica. (10)

Sustrato ...	Actividad (unidad/ensayo)	
	L-arginina 125 mM	L-canavanina 125 mM
Isoenzima III de la glándula submaxilar (sin movimiento)	0.343	0.033
Isoenzima I del riñón	0.158	0.065
Isoenzima II del riñón (sin movimiento)	0.047	0.025

Los extractos de glándula submaxilar (0.5 de unidad) o de riñón (0.35 de unidad) se sometieron a electrofóresis anódica; los geles por duplicado se rebanaron y la actividad de arginasa fué determinada con L-arginina o L-canavanina como sustrato.

Las observaciones inmunológicas fueron consistentes con los resultados obtenidos por electrofóresis. El antisuero contra la arginasa de hígado de rata adulto o fetal (isoenzima III) interactuó con la enzima de la glándula submaxilar, pero no inactivó a las arginasas de riñón, intestino delgado, glándula mamaria y pancreas.

La heterogeneidad de las arginasas en los tejidos de rata es aparente a partir de las diferencias en sus propiedades de solubilización y a partir de la observación de que sus actividades aumentan o disminuyen a causa de la preincubación a 60°C (Tabla 32). Por otro lado, todos los resultados confirman que la isoenzima III presente en la glándula submaxilar es idéntica a la del hígado. Como la actividad de ornitina carbamil transferasa no se detecta en la glándula submaxilar (10), la isoenzima III no puede estar involucrada solamente en la catálisis del ciclo de la urea sino que debe funcionar en otra ruta del catabolismo de ornitina.

Tabla 34. Resumen comparativo de algunas propiedades de las isoenzimas de arginasa en tejidos de rata. (25,10)

Arginasa	Isoenzimas	Inmunología (antisuero de conejo contra arginasa de hígado)	Estabilidad al calor (55 - 60 °C)
Hígado:	III (10)	reacciona (10)	estable (24)
Riñón:	I II (10)	no reacciona (10,24)	poco estable (24)
Glándula mamaria:	I II (10)	no reacciona (24)	labil (24)
Intestino delgado:	I II (10)	no reacciona (10,24)	poco estable (24)
Glándula submaxilar:	III (10)	reacciona (10)	estable (24)
Páncreas:	I II (10)	no reacciona (10)	
Hepatoma 7777:	III (10)	reacciona (10)	labil (10)

Los números entre paréntesis indican las referencias bibliográficas.

Arginasa en riñón de rata.

Kaysen et al (72), purificaron parcialmente a la arginasa de riñón de rata y compararon algunas de sus propiedades con la arginasa de hígado.

En contraste con la arginasa de hígado de rata (207,208), la enzima de riñón es difícil de solubilizar. La homogeneización en soluciones conteniendo KCl, MnCl₂, Tris-HCl o sacarosa,

permitió la liberación de menos de 20 % de la actividad total de arginasa. Extracciones repetidas con soluciones de sacarosa 0.25 mM, más de 4 veces, solubilizaron menos del 50 % de la enzima total en el riñón.

Los datos que se presentan en la Tabla 35 demuestran que la mayor parte de la actividad de arginasa del riñón está asociada a la fracción mitocondrial. La actividad obtenida en la fracción sobrenadante-microsomal y en los lavados de la fracción nuclear, fue debida a la contaminación mitocondrial.

Tabla 35. Distribución subcelular de la arginasa del riñón de rata. (72)

Fracción:	Actividad unidades totales	Unidades/g	X
-Microsomal + sobrenadante	17.8	7.40	15.8
-Mitocondrial	72.0	30.0	67.6
-Nuclear lavada	0	0	0
-Lavados de la fracción nuclear	18.7	6.95	15.6

El tejido de riñón (2.4 g) fué inicialmente lavado con solución de sacarosa 0.25 M -Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5. Las fracciones fueron obtenidas por técnicas de homogeneización y centrifugación (1,000 x g durante 10 min).

Al sujetar los homogeneizados de riñón a un congelamiento y descongelamiento preliminar o a un tratamiento con acetona, fué posible extraer 50-60 % de la actividad total de arginasa. Sin embargo, la mejor producción y la actividad específica más alta se obtuvieron cuando la fracción mitocondrial fué inicialmente

congelada en solución de sacarosa, descongelada y sonicada. El extracto obtenido después de centrifugar, fué usado para la purificación de la enzima (Tabla 36).

Tabla 36. Purificación de la arginasa de riñón de rata a partir de la fracción mitocondrial. (72)

Etapas	Actividad total	Proteína total	Act. específica	Recuperación
	unidades	mg	unidades/mg	%
-Homogeneizado:	1920	12800	0.15	100
-Mitocondria:	1510	3940	0.38	79
-Sonicación y centrifugación:	1530	1210	1.26	80
-Primer fraccionamiento con (NH ₄) ₂ SO ₄ :	1510	428	3.06	68
-Calentamiento	1050	141	7.42	55
-Segundo fraccionamiento con (NH ₄) ₂ SO ₄ :	905	94	9.65	47
-Cromatografía sobre DEAE-Celulosa:	867	41.5	20.9	45
-Tercer fraccionamiento con (NH ₄) ₂ SO ₄ :	648	28.6	23.9	36

El procedimiento de purificación fué iniciado con 52 g de riñón de rata. Todos los pasos de purificación (excepto en el calentamiento) se llevaron a cabo a 0-4°C.

Comparación de las propiedades de arginasa de riñón e hígado (72):

- a) Tratamiento con acetona. La precipitación con acetona es uno de los pasos comunmente usados para la purificación de arginasa de hígado de rata. La enzima de riñón se extrae parcialmente en medio acuoso después de tratar el homogeneizado con acetona. El tratamiento con acetona de la arginasa de riñón, en contraste con la arginasa de hígado, convierte a la enzima en una forma que es oxidada con relativa facilidad.
- b) Cromatografía. La arginasa de hígado en solución a pH 7.5 no es absorbida en DEAE-celulosa pero si es retenida en CM-celulosa, de la cual se puede extraer con soluciones de sal. Bajo las mismas condiciones, la enzima de riñón no es retenida ni en DEAE ni CM-celulosa. La arginasa de riñón tiene un peso molecular de alrededor de 120,000 (31).
- c) Estabilidad. La arginasa de riñón retiene su actividad total a 60°C durante 10 min en presencia de glicina y Mn^{+2} , una propiedad también exhibida por la arginasa de hígado (207,208).

Periodos prolongados a esta temperatura producen una disminución progresiva de la actividad con un tiempo de vida media de 100 min. La arginasa de hígado de rata es completamente estable a 60°C, por lo menos 20 min (207,208). En contraste adicional con la enzima de hígado, la arginasa de riñón pierde su actividad al ser dializada contra soluciones

combinadas o separadas de Tris-HCl, $MnCl_2$ y KCl, o al pasar la enzima a través de una columna de Sefadex G-25.

- d) Efecto de los iones metálicos. En contraste con la arginasa de hígado, la incubación con Mn^{+2} , no aumenta la actividad de arginasa del riñón y ninguno de los iones probados inducen un cambio en el pH óptimo (Tabla 37). Las determinaciones enzimáticas después de éstos periodos de incubación, demostraron que la actividad fué completamente retenida en soluciones de Mn^{+2} o Mg^{+2} y quizá en una menor proporción, en solución de EDTA. Los iones Fe^{+3} , Hg^{+2} , Co^{+1} , Cd y Ni^{+3} decrecieron la actividad enzimática (Tabla 37). Por otra parte, se ha demostrado que la enzima de hígado es activada por iones Mn^{+2} , Co^{+1} , Ni^{+3} o Fe^{+3} (79)

- e) Especificidad de sustrato. Las principales diferencias en la especificidad de la arginasa de riñón e hígado fueron observadas con L-canavanina y L-homoarginina (Tabla 18). La canavanina es hidrolizada 5 veces más rápido por la arginasa de riñón, mientras que la homoarginina no es atacada por la misma enzima.

La arginasa de hígado hidrolizó a la homoarginina a una velocidad lenta; la hidrólisis completa del compuesto fué obtenida a través de periodos de incubación prolongados, con una alta concentración de enzima. Utilizando arginina como sustrato, los valores de K_m obtenidos a partir de las gráficas de doble recíproco de Lineweaver - Burk fueron: 18 mM para la enzima de riñón y 6.8 mM para la

enzima de hígado, a pH 9.5. A altas concentraciones de arginina (por arriba de 0.72 M), no se observó inhibición de la arginasa de hígado, en el rango de pH 7.4-10.0.

Las mismas concentraciones de sustrato inhiben a la arginasa de riñón a valores de pH bajos, y la activan a valores de -

pH altos.

Tabla 37. Inactivación de la arginasa de riñón de rata por iones metálicos. (72)

Componente presente	Actividad retenida después de 30 min. a 37°C (1)	Actividad retenida después de 20 hrs. a 5°C (2)
- MnCl ₂	100 *	94
- EDTA	98	78
- MgCl ₂	97	88
- CoCl ₂	89	18
- HgCl ₂	65	--
- CdSO ₄	50	23
- FeSO ₄	48	0
- NiSO ₄	38	15

Las preparaciones de arginasa de riñón, de actividad específica 1.5 unidades/mg, fueron incubadas en soluciones conteniendo Tris 0.005 M y arginina 0.005 M a pH 7.5. Cada uno de los compuestos fué adicionado a una concentración final de 0.01 M. En cada caso las incubaciones fueron conducidas a 37°C durante 30 min y a 5°C durante 20 h.

* La misma actividad que la obtenida por incubación del control, el cual contuvo MnCl₂ 0.1 mM.; --, no determinado.

Tabla 38. Especificidades relativas de sustrato para la arginasa de hígado y riñón de rata. (72)

Sustrato	Actividad relativa	
	Arginasa de riñón	Arginasa de hígado
L-Arginina	100	100
α -Guanidinobutirato	0	0
β -Guanidinobutirato	0	---
L-canavanina	38	5.6
L-homoarginina	0	0.35

Los sustratos se usaron a una concentración 0.1 M. La preparación de arginasa de riñón tuvo una actividad específica de 24.9 unidades/mg de tejido y la de la enzima de hígado una actividad específica de 1,250 unidades/mg. Los valores dados son relativos a la velocidad de hidrólisis de L-arginina.

---, no determinado.

- f) Inhibidores. Para el efecto inhibitorio se probaron varios análogos de sustrato, aminoácidos, productos del metabolismo de ornitina y otros compuestos que se han reportado como inhibidores de arginasa de hígado (Tabla 39). Los resultados obtenidos con Γ -guanidinopropionato, Γ -guanidinobutirato, Γ -aminovalerato, Γ -guanidinopropionato, espermina, cada-verina, espermidina, putrescina y aspartato no se muestran en la Tabla 39. Ninguno de éstos compuestos a una concentración 0.01 M, exhibió inhibición.

Tabla 10. Inhibidores de la actividad de arginasa de riñón e hígado de rata. (72)

	Velocidad relativa de hidrólisis		
	Concentración durante la reacción (M)	Arginasa de riñón	Arginasa de hígado
L-Canavanina	0.01	97	80
DL-Homocisteína	0.02	28	84
Borato	0.02	4	1.0
L-homoarginina	0.02	96	85
L-Lisina	0.01	30	61
L-Lisina	0.003	52	75
L-Prolina	0.04	33	61
L-Ornitina	0.005	40	78
L-Isoleucina	0.01	46	33
L-Metionina	0.01	99	90
L-Leucina	0.025	63	43
L-Valina	0.01	40	35
NaCl	1.00	100	69
L-glutamato	0.800	103	--
L-glutamato	0.85	---	77

La preparación de arginasa de riñón tuvo una actividad específica de 23.9 unidades/mg y la de la enzima de hígado una actividad específica de 1250 unidades/mg. El pH de la solución de cada compuesto fue ajustado a 9.3 mediante la adición de HCl o KOH. La velocidad de hidrólisis de arginina en ausencia de inhibidores es tomada como 100. ---, no determinado.

En general, la susceptibilidad a la inhibición por diferentes compuestos probados fue paralela para ambas enzimas. Sin embargo, el NaCl o ácido glutámico en concentraciones relativamente altas inhibieron a la enzima hepática sin ningún efecto sobre la arginasa de riñón. La canavanina y homoarginina fueron inhibidores para la enzima de hígado

solamente, mientras que la homocisteína, lisina, prolina y ornitina tuvieron un efecto más fuerte sobre la arginasa de hígado.

- g) Estudios inmunológicos. El antisuero preparado para la arginasa de hígado pura, no da reacción cruzada con la enzima de riñón de rata, parcialmente purificada.

Los resultados demostraron que la actividad de arginasa de hígado de rata es aproximadamente 30 veces mayor que la actividad de arginasa en el riñón del mismo animal. Esta diferencia en la actividad puede significar que el riñón contenga una pequeña cantidad de la misma enzima hepática o que las dos actividades sean debidas a diferentes enzimas con distintos números de recambio (72).

Arginasa en el intestino delgado de rata.

Harri et al (12) demostraron que la mucosa del intestino delgado de rata contiene actividad de arginasa. La cantidad de urea sintetizada por la arginasa intestinal fué 3.0 % en hembras y 2.8 % en machos, comparada con la del hígado. La parte glándular del estómago fué prácticamente inactiva en la síntesis de urea (Tabla 40).

Tabla 40. Síntesis total de urea en el hígado, moco intestinal (duodeno, yeyuno e íleon), mucosa glandular ventricular de rata. (12)

Órgano	Rango de actividad de arginasa (µmol urea/min/órgano entero)
a) Hembras (7):	
Hígado	998 - 1280
Mucosa duodenal	1.7 - 5.3
Mucosa yeyunal	10.5 - 32.7
Mucosa ileal	5.9 - 25.1
Mucosa total del intestino delgado	20.3 - 60.1
Mucosa glandular ventricular	0.0 - 0.3
b) Machos (12):	
Hígado	849 - 2400
Mucosa duodenal	1.8 - 2400
Mucosa yeyunal	7.4 - 43.3
Mucosa ileal	4.1 - 23.3
Mucosa total del intestino delgado	19.0 - 73.6
Mucosa glandular ventricular	0.1 - 0.6

[] Número de casos.

También se ha demostrado actividad de arginasa en la mucosa intestinal de perro, gato, conejo y ratón (72).

Fujimoto et al (31) purificaron la arginasa de intestino delgado de rata y compararon sus propiedades con las enzimas de hígado y riñón del mismo animal. La Tabla 41 muestra los pasos utilizados en la purificación de la arginasa intestinal. Durante el proceso de purificación fue necesaria la presencia de L-valina para evitar la desnaturalización de la enzima.

Tabla 41. Purificación de la arginasa de intestino delgado de rata. (31)

Etapa	Proteína total mg	Act. total * unidades	Act. específica unidades/mg	Producción %
1. Extracto crudo:	35,640	11,940	0.34	100
2. Calentamiento:	24,170	12,800	0.53	107
3. Fraccionamiento con metanol:	2,700	10,940	4.05	92
4. Fraccionamiento con (NH ₄) ₂ SO ₄ :	1,230	8,580	6.98	72
5. Hidroxilapatita	445	4,680	10.5	39
6. Primera columna en DEAE-celulosa:	22.5	2,550	113	21
7. Sephadex G-200	4.1	1,125	274	9.4
8. Segunda columna en DEAE-celulosa:	0.28	214	761	1.8

Se utilizaron 600 g de intestino delgado entero de rata macho.

* La actividad enzimática a cada paso de la purificación fue medida en presencia de L-valina 5 mM; bajo estas condiciones la actividad fue aproximadamente la mitad de la actividad en ausencia de L-valina. La enzima del paso 8 fue purificada aproximadamente 2,238 veces.

Propiedades de la arginasa del intestino delgado:

- a) Estabilidad durante el almacenamiento. La arginasa intestinal es extremadamente labil; ésta pierde 80% de su actividad en un día a -10°C y 50% de su actividad en 2 a 3 días a 4°C.

Sin embargo, la enzima fue estable al almacenamiento por lo menos 10 días a 4°C en presencia de L-valina o L-leucina 25 mM, que son inhibidores competitivos. Los aminoácidos L-metionina y L-alanina, los cuales no inhibieron la actividad enzimática, tuvieron un efecto menor en la estabilidad de la enzima.

- b) Estabilidad al calor. La presencia de L-valina 25 mM en la solución enzimática durante el tratamiento con calor, protege a la enzima contra la inactivación. En ausencia de L-valina, cerca de 35 %, 75 % y 80 % de la actividad inicial es pérdida con el calentamiento a 50, 55 y 60 ° C, respectivamente, durante 2 min, mientras que en presencia de L-valina no hay pérdida de actividad al calentar a 60°C por 2 min. En ausencia de L-valina la enzima es inactivada progresivamente por incubación a 50 °C durante 5 min, mientras que en presencia de L-valina no hay pérdida de actividad al calentar a 60°C por 2 min. En ausencia de L-valina la enzima es inactivada progresivamente por incubación a 50°C durante 5 min, mientras que en presencia de L-valina ésta retiene actividad al calentar a 55° C durante 5 min.
- c) Efecto del pH. La arginasa de intestino delgado mostró una actividad alta entre pH 9.5 y 10.4.
- d) Especificidad de sustrato. Los derivados de guanidina enlistados en la Tabla 41 se probaron como posibles sustratos

para la arginasa del intestino delgado. La enzima mostró una alta especificidad por el L-isómero de arginina y no hidrolizó al D-isómero. La constante de Michaelis, calculada a partir de la gráfica de Lineweaver-Burk fué 19 mM.

Tabla 42. Especificidad de sustrato de la arginasa de intestino delgado de rata. (31)

Sustrato	Actividad relativa
L-Arginina	100
γ -Glutamido-butirato	0.0
L-Canavanina	17.5
L-Homoarginina	3.5
D-Arginina	0.0

Se utilizó la enzima libre de L-valina a partir del octavo paso de purificación. La concentración final utilizada de cada sustrato fué 0.1 M. Las actividades se muestran relativas a la velocidad de hidrólisis de L-arginina.

- e) Efecto de los aminoácidos en la actividad de arginasa intestinal. Como se muestra en la Tabla 43, lisina, ornitina, valina, e isoleucina fueron fuertes inhibidores y leucina, triptófano, y prolina causaron ligera inhibición. Entre los aminoácidos inhibidores, el triptófano fué no competitivo y los otros aminoácidos fueron competitivos.
- f) Efecto del EDTA. Se utilizaron preparaciones de arginasa de riñón e intestino delgado a partir del tercer paso de purificación (Tabla 41), las cuales fueron tratadas con EDTA 0.1 M a pH 4.5. La arginasa renal fué disociada por éste tratamiento, mientras que la enzima intestinal no fué afectada.

Tabla 43. Efecto de varios L-aminoácidos sobre la actividad de arginasa del intestino delgado de la rata. (31)

Adición	I de inhibición
Lisina	79
Ornitina	72
Valina	63
Leucina	46
Isoleucina	54
Metionina	3
Triptófano	26
Fenilalanina	0
Tirosina	0
Histidina	0
Prolina	10
Hidroxiprolina	7
Alanina	5
Treonina	9
Glutamina	8
Glutamato	12
Aspartato	0

Se utilizó la enzima libre de L-valina obtenida a partir del sexto paso de purificación, a una concentración de 10 mM. La actividad total fue tomada como la velocidad de hidrólisis de L-arginina en ausencia de otros aminoácidos.

Comparación de las propiedades de arginasa de hígado, riñón e intestino delgado de rata (31):

La arginasa del intestino delgado fué extremadamente lábil al almacenamiento a baja temperatura en ausencia de L-valina, y perdió la mitad de su actividad cuando se dializó toda la noche en solución de amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, conteniendo KCl 0.1 M y glicina 10 mM. La L-valina que es un fuerte inhibidor competitivo, tiene un efecto estabilizador sobre la arginasa de intestino delgado. Este efecto puede ser debido a la protección del (o los) sitio(s) activo(s) de la

enzima hacia la desnaturalización durante el almacenamiento o diálisis. La enzima es tan lábil que la purificación (tabla 41) no pudo llevarse a cabo a partir del tercer paso sin la adición de L-valina.

En contraste, una preparación purificada de arginasa de hígado puede ser almacenada en el estado de congelación por varias semanas ó por 6 semanas a 4°C sin pérdida de la actividad (207). La arginasa de riñón es estable por lo menos 12 días en presencia de L-arginina 5 mM a 0-4°C, pero 75 % de su actividad catalítica se pierde en 12 días de almacenamiento a -15°C (72).

Las arginasas de hígado y de riñón son estables a 60°C durante 20 y 10 min, respectivamente (207,72). Glass y Knox reportaron que la arginasa intestinal es progresivamente inactivada por calentamiento a 60°C durante 10 min, hasta en presencia de L-arginina 0.15 M. La preparación de Fujimoto et al (31), perdió 70 % de su actividad original por calentamiento a 60°C durante 2 min, aunque la L-valina aumentó la estabilidad de la enzima contra la desnaturalización térmica. Estos resultados sugieren que la arginasa intestinal es más inestable que las arginasas de otros tejidos de rata con respecto al almacenamiento o tratamiento con calor.

Se ha demostrado que la arginasa de hígado es una proteína básica (207). La arginasa intestinal es una proteína neutra o ligeramente ácida, ya que esta es adsorbida en celulosa-DEAE a pH 8.0. Hirsch-Kolb et al (61) sugirieron que las arginasas neutras o ligeramente ácidas pueden ser menos estables debido

a que el Mn^{2+} se disocia de su complejo enzima-sustrato con mayor facilidad.

El pH óptimo de la arginasa intestinal (pH 10.0) es similar al de la arginasa de hígado de rata (208) pero se ha reportado que las arginasas de riñón, cerebro, y glándula submaxilar tienen dos pH óptimos, 7.5 y 9.5 (31).

La preparación de arginasa intestinal fué específica para L-arginina y no hidrolizó D-arginina. Se ha demostrado que una arginasa del intestino delgado de conejo (heteroarginasa) hidroliza al isomero D-arginina (31). La constante de Michaelis de la arginasa intestinal para L-arginina fue 19 mM (31). Este valor es mayor que el de la enzima de hígado (6.8 mM) y es similar al de la enzima de riñón (18 mM) (72). Los grados de inhibición de la arginasa intestinal por aminoácidos fueron muy similares a los de la enzima de riñón. Sin embargo, L-lisina y L-ornitina inhiben a la arginasa intestinal competitivamente, pero causan inhibición de tipo mezclado en la arginasa renal. Los dos aminoácidos tienen un efecto menor sobre la arginasa hepática (72).

Se ha demostrado que las arginasas de hígado, riñón e intestino de rata tienen pesos moleculares similares (120,000) obtenidos por filtración en gel (68,31).

La arginasa de hígado de rata se disocia en subunidades inactivas a pH 2.0 pero su actividad es restaurada rápidamente sobre la neutralización subsecuente seguida de la incubación a 37°C en presencia de Mn^{2+} durante 3-5 min (7). Se han obtenido resultados similares con la arginasa de hígado de conejo (6).

Sin embargo, la actividad de arginasa en el intestino de rata no fué restaurada después del tratamiento a pH 2.0 (31). La arginasa de riñón de rata fué disociada en subunidades por tratamiento con EDTA a pH 4.5 y después de este tratamiento la enzima fué completamente inactiva cuando se ensayo en ausencia de Mn^{+2} . Sin embargo, se observó casi 50 % de su actividad original cuando la actividad fue ensayada en presencia de Mn^{+2} (31). Se han obtenido resultados similares con la arginasa de hígado de rata. La arginasa intestinal no fué disociada por tratamiento con EDTA a pH 4.5 y retuvo actividad residual cuando se ensayo en ausencia de Mn^{+2} . Su actividad fue parcialmente restaurada en presencia de Mn^{+2} , aunque a una extensión menor que la arginasa de riñón (31). Estos resultados sugieren que la arginasa intestinal no se disocia realmente o que la enzima no está compuesta por subunidades.

Arginasa en cerebro de ratón

Stewart et al (30) estudiaron a la arginasa de cerebro e hígado de ratón con el objeto de determinar si la actividad en ambos tejidos es debida a la misma enzima. Sus resultados demostraron que la actividad de arginasa en el tejido hepático es 1,000 veces más alta que la encontrada en el tejido cerebral. Las actividades específicas obtenidas para la arginasa hepática fueron 14 mol de urea producida/min/mg de proteína y 26,000 mol de urea/min/g de tejido, mientras que los valores correspondientes para la arginasa de cerebro fueron 0.0135 y 23.

La activación normal de la arginasa de hígado de rata ocurre a 55°C en MnCl 0.01 M, durante 5 min (208). En este estudio se encontró que 10 min a temperaturas en el rango de 30 a 60°C, fueron suficientes para dar la activación completa de la arginasa de hígado y cerebro.

Los experimentos demostraron que el hígado de ratón contiene una actividad de arginasa, mientras que el cerebro contiene dos. Los homogeneizados de cerebro e hígado de ratón fueron sometidos a electroforesis en gel de acrilamida al 5%. Ambos tejidos mostraron una actividad de arginasa que migró 6-8 mm dentro del gel de disco. Esta es en efecto, la única actividad de arginasa que fue detectada en el tejido hepático. El tejido de cerebro mostró un pico de actividad adicional que migró dentro del gel a aproximadamente 22-24 mm, en relación a la arginasa con movimiento más lento. Una de las enzimas del cerebro fue distinta de la enzima de hígado al ser determinada por fraccionamiento en DEAE-celulosa, CM-celulosa y electroforesis en gel de disco. La segunda enzima del tejido cerebral presentó propiedades similares a la de la enzima hepática al ser sometida a las mismas técnicas de fraccionamiento. Sin embargo, esta arginasa puede ser distinguida de la enzima de hígado por su valor de K_m para arginina y su labilidad al calor (Tabla 44).

Tabla 44. Propiedades de las argininas de hígado y cerebro de ratón. (10)

Enzima *	Tiempo de vida media ** (min. 75 °C)	Km para ** arginina
Hígado II	18	14 mM
Cerebro II	123	32 mM
Cerebro I	126	38 mM

* Cada enzima fué obtenida a partir del paso de purificación con CM-celulosa. El fraccionamiento de ambas argininas de hígado y cerebro sobre CM-celulosa se llevó a cabo después de una purificación parcial mediante precipitación con acetona y tratamiento con calor de acuerdo con el método de Schirke (207).

** Promedio de tres determinaciones.

La diferencia entre los valores de Km para las dos enzimas (14 mM para la enzima de hígado y 32 mM para la del cerebro), no fué grande. Además de las propiedades mencionadas, las enzimas de cerebro e hígado también difirieron en sus respuestas a la activación con manganeso. Para cantidades equivalentes de enzima (actividad), la concentración de manganeso requerida para la activación completa de la arginasa II de hígado, fué aproximadamente 100 veces menor que la requerida para la activación de la arginasa II del cerebro. A partir de estos resultados, se concluyó que ambas argininas en el cerebro difieren de la enzima de hígado de ratón. No se detectó interconversión de las enzimas del cerebro, y el peso molecular de todas las argininas fué el mismo (dato no reportado) (38).

Los resultados obtenidos con el cerebro e hígado de ratón fueron confirmados con tejidos de bovino. Después de la purifi-

cación parcial de las enzimas, la cromatografía sobre CM-celulosa demostró que el hígado de vaca contiene solo una arginasa, mientras que el cerebro contiene dos. El sistema bovino no fue estudiado para obtener información adicional ya que la arginasa de hígado de vaca difiere de la arginasa del hígado de ratón (y rata) en que esta no es unida en CM-celulosa al pH usado (pH 7.0). Esto es de esperarse ya que Harell y Sokolovsky (119) reportaron que la arginasa de hígado de vaca es una proteína ácida.

Juzgando por la movilidad electroforética (10), fraccionamiento en CM-celulosa y K_m para arginina (72), las enzimas I y II del tejido cerebral (30) son comparables a las enzimas encontradas en el riñón de rata.

Arginasa en epidermis de ratón

En 1981, Verma y Botwell (9) aislaron a la arginasa de epidermis de ratón. La actividad de la enzima se detectó en las fracciones soluble y particulada (Tabla 45). Cerca de 75 % de la actividad total de arginasa fue encontrada en la fracción soluble y 25 % en el precipitado lavado de la epidermis.

Ambas enzimas en la fracción soluble y particulada, revelaron valores de K_m similares (13 mM), determinados a partir de las gráficas de Edie-Hofstee. Además, las dos enzimas exhibieron pH óptimo similar (pH 9.5) y curvas de desnaturalización por calor idénticas. Ambas enzimas soluble e insoluble, necesitaron

Tabla 45. Actividad de arginasa en las fracciones soluble y particulada de la epidermis de ratón. (9)

Fracción	Actividad total	Actividad específica	I de la Act. total
	nmol CO/30 min	nmol CO/30 min/ μ g de proteína	
-Homogeneizado entero	181908	8,17	100
-Sobrenadante	122832	11,08	73
-Precipitado	41484	3,99	25

Los homogeneizados epidérmicos fueron centrifugados a 100,000 x g. El precipitado se lavó dos veces con el amortiguador de homogeneización y los lavados fueron adicionados a la fracción del sobrenadante.

de la presencia de Mn^{2+} para la actividad máxima. La actividad de arginasa en la fracción particulada aumentó 50 % por precalentamiento a 50 ó 55°C, con exceso de $MnCl$ (15 mM). La actividad enzimática de las dos fracciones, en ausencia de $MnCl$, disminuyó precipitadamente durante el calentamiento.

Arginasa en la próstata ventral de rata

Yamanaka et al (197) compararon las actividades de arginasa en la prostata ventral, riñón e hígado de rata. La actividad enzimática de los tres tejidos fué encontrada en la fracción del sobrenadante y del precipitado después de centrifugar a 12,000 x g durante 20 min. Los resultados están resumidos en la Tabla 46.

Tabla 46. Distribución de actividad de arginasa en el sobrenadante y precipitado obtenido de próstata ventral riñón e hígado de rata. (197)

	Actividad de arginasa ($\mu\text{mol urea}/\text{min}/\text{g}$)		
	Homogeneizado total	Sobrenadante (12,000 x g)	Precipitado (12,000 x g)
-Próstata ventral	3.03 \pm 0.13 [3]	2.20 \pm 0.15 [3]	0.96 \pm 0.02 [3]
-Riñón	14.04 \pm 0.88 [3]	2.63 \pm 0.05 [3]	9.35 \pm 1.44 [3]
-Hígado	1148.30 \pm 62.0 [3]	1004.70 \pm 20.2 [3]	183.74 \pm 17.9 [3]

Los valores representan la media \pm E.E. (error estandar de la media) y los números en los paréntesis indican el número de ensayos. Los homogeneizados se prepararon en solución de ácido maleico 10 mM conteniendo HCl, 30 mM y fueron centrifugados a 12,000 x g durante 20 min. Los sobrenadantes y precipitados resultantes fueron utilizados para el ensayo de la actividad de arginasa.

Entre los tejidos examinados, el hígado exhibió la actividad enzimática más alta. La actividad de arginasa en el sobrenadante de hígado fué 5 veces mayor que en el precipitado. En la próstata ventral, la actividad en el sobrenadante fué 2.3 veces más grande que en el precipitado, mientras que por el contrario, el riñón mostró una relación inversa, ya que la actividad en el sobrenadante fué solo 1/4 de la del precipitado.

El tratamiento con Tritón X-100 decreció las actividades enzimáticas en los precipitados de riñón y próstata ventral, sugiriendo que la arginasa de la fracción particulada esta localizada en los elementos membranosos.

Las arginasas del sobrenadante y precipitado del riñón y próstata ventral mostraron valores de Km similares para L-arginina (Tabla 47).

Tabla 47. Constantes de Michaelis para las enzimas de próstata ventral, riñón e hígado de rata. (197)

	pH de reacción	Sobrenadante (12,000 x g)	Precipitado (12,000 x g)
		Km (mM)	Km (mM)
-Próstata ventral:	10.0	3.1	3.0
-Riñón:	10.0	3.0	3.8
-Hígado:	10.0	6.1	5.7
	8.0	3.0	4.2

Los tejidos fueron homogeneizados en Tris-HCl 10 mM (pH 7.5)- KCl 100 mM - NaCl, 30 mM y centrifugados a 12,000 X g durante 20 min. El precipitado resultante fue tratado con Tritón K-100 para solubilizar a la arginasa. Los valores de Km fueron estimados a partir de las gráficas de doble recíproco de la actividad usando concentraciones de sustrato en el rango de 2.5×10^{-4} M a 2.5×10^{-2} M. Para la incubación se utilizó amortiguador de glicina (pH 10.0) y Tris-HCl (pH 8.0).

El efecto de los iones manganeso sobre la actividad de arginasa en el sobrenadante (12,000 X g) y precipitado (600 X g) fué examinado para la próstata ventral y riñón de rata. En ambos tejidos se observó un mayor efecto del Mn^{+2} (6 mM) en la activación enzimática del sobrenadante que en la del precipitado.

La Tabla 48 muestra un resumen comparativo de las principales propiedades de las arginasas en el hígado y en tejidos extrahepáticos de varias especies animales.

Tabla 48. Comparación de las principales propiedades de la arginasa hepática y extrahepática en diferentes animales.

Animal	Tejido	Peso molecular	pH óptimo	Km para L-arginina	Coefficiente de sedimentación
		Daltones		(mM)	(S)
Rata	Hígado	120,000-142,000 (31, 64, 100, 207)	10-10.6 (24, 64, 208)	2.4; (208) 6.8; (72) 13-45; (24) 20-40; (122)	6.1 S (68)
Rata	Riñón	120,000 (31)	7.5 y 9.3 (31)	18.0; (72)	
Rata	Intestino delgado	120,000 (31)	10 (31)	19.0; (31)	
Caballo	Hígado	138,000 (6)		7.0; (122)	5.9 S (6)
Conejo	Hígado	138,000 (6)		1.4; (6)	
Oveja	Hígado			7.0; (122) 9-28; (119)	
Vaca	Hígado	115,000-120,000 (119)	9.5-10.5 (119)	1.0; (166) 10.8; (74, 119)	
Ratón	Epidermis		9.5 (9)	13.0; (9) 20-40; (122)	
Ratón	Cerebro		32 y 38 (30)		

Los números en los paréntesis indican las referencias bibliográficas. Los métodos y condiciones utilizadas para la determinación de las diferentes propiedades varían de un investigador a otro.

Arginasa en suero

En 1968, Kihara et al (66) compararon la actividad de arginasa en el suero de diferentes mamíferos (Tabla 49).

Tabla 49. Actividad de arginasa en el suero de diferentes mamíferos. (66)

Suero:	Muestra	Actividad de arginasa (μ mol de urea formada/hr/ml)
Caballo (adulto)	1	0.7
	2	0.0
Humano (adulto)	1	0.3
	2	0.2
Ternera recién nacida	1	0.1
	2	1.0
	3	0.0
	4	0.0
Fetal de ternera	1	11.6
	2	9.2
	3	7.2
	4	5.0
	5	5.4

Las muestras fueron obtenidas a partir de diferentes lotes.

La mayor actividad de arginasa fué observada en el suero fetal de ternera (SFT). Este suero se usa frecuentemente en medios de cultivo como nutriente, para clonar y para iniciar cultivos primarios. La degradación de arginina en el SFT es debida a la presencia de arginasa. Así, en cultivos prolongados en don-

de se utiliza SFT, el agotamiento de arginina puede ocurrir a menos que el medio sea cambiado frecuentemente (25). La Km para la arginasa de SFT es 6.3 mM (119).

En experimentos en donde se utilizan suplementos de suero comercial, es necesario tomar precaución al interpretar resultados, pues existe una variabilidad muy grande entre los factores químicos y endócrinos que intervienen al usar un tipo de suero u otro (69).

Holtta et al (25) demostraron que distintos lotes de SFT presentan diferencias de más de 100 veces en la actividad de arginasa (Tabla 50).

Tabla 50. Actividad de arginasa en sueros de diferentes animales. (25)

Suero	Número de muestras	Rango de actividad de arginasa (nmol de ornitina formada/h/mg de proteína)
Fetal de ternera	[6]	4.0-980
Ternera recién nacida	[6]	0.5-6.9
Humano	[6]	0.3-2.0
Caballo	[6]	0.4-2.1
Cerdo	[2]	1.2-2.3
Cuyo	[1]	1.7
Conejo	[1]	9.0
Ferret	[1]	3.4
Gallina	[1]	2.1

Si se considera que el medio suplementado con 10 % de suero contiene aproximadamente 6 mg de proteína/ml, aún así la baja actividad de arginasa es capaz de producir suficiente ornitina a partir de la arginina presente en el medio, para apoyar el crecimiento celular (25).

Función de la arginasa extrahepática

La función de las actividades de arginasa relativamente bajas en tejidos extrahepáticos aún no es bien conocida y la distribución de la función del ciclo de la urea en otros tejidos aparte del hígado, es incierta.

Las posibles funciones de las arginasas no hepáticas se han sugerido para el riñón (72), intestino delgado (12,31), glándula mamaria lactante (11,13), cerebro (34,93), epidermis (9) y tiroides (23).

Función en el riñón e intestino delgado

El riñón (72) e intestino delgado (31) son dos tejidos extrahepáticos que contienen actividades significativas de arginasa. Estos tejidos contienen también niveles bajos pero detectables de carbamilo fosfato sintetasa y ornitina carbamil transferasa. Debido a esto, algunos investigadores (132) han sugerido que el ciclo de la urea puede operar en el tejido renal e intestinal.

Kaysen et al (72) propusieron que la función más probable para la arginasa renal es la de iniciar la secuencia de reacciones que metabolizan arginina en prolina y/o glutamato, vía ornitina. La importancia de esta ruta puede ser evidente en otros animales como gallinas (81,141,200) e insectos (73), así como en células en cultivo de tejido (25); estos no sintetizan arginina y por lo tanto la requieren para su supervivencia. En algunos organismos (73), la conversión de arginina en prolina ha sido reportada, aunque la importancia de arginina vs glutamato como precursor de prolina no ha sido confirmada en todas las situaciones. En algunas células en cultivo de tejido, la ruta de glutamato a prolina parece predominar. Es probable que los controles de estas rutas varíen dependiendo de las especies, tejidos, nutrición y desarrollo.

En el intestino delgado, Fujimoto et al (31) sugirieron que la arginasa juega un papel importante en la proliferación celular, suministrando ornitina como un material crudo para la síntesis de espermina y espermidina. Esta sugerencia está basada en la observación de que las células epiteliales del intestino tienen concentraciones relativamente altas de poliaminas, las cuales se sabe que aceleran la proliferación celular. Se ha observado que la actividad de ornitina descarboxilasa es 7 a 8 veces mayor en el intestino delgado que en el hígado de rata (31).

Función en la glándula mamaria lactante

Una acumulación ordenada de enzimas particulares ocurre en la glándula mamaria al principio y durante la lactancia (63). Una de estas enzimas es la arginasa. La función de la alta actividad de arginasa en la glándula mamaria se ha relacionado con la actividad de otras enzimas que también se acumulan durante la lactancia.

El desarrollo de la actividad de arginasa en la glándula mamaria lactante fué descubierto por Folley y Greenbaum en 1947 (94). Estos investigadores estudiaron los cambios en el contenido de arginasa y fosfatasa alcalina en el tejido mamario de rata durante diferentes fases de crecimiento y funciones características de la preñez, lactancia e involución. Al mismo tiempo, determinaron la actividad de arginasa en el hígado y la actividad de fosfatasa alcalina en el riñón.

Los resultados demostraron que la actividad de arginasa en la glándula mamaria aumenta lentamente durante la preñez y en la lactancia temprana, experimentando un incremento dramático entre los días 5 y 10. La actividad alcanza un máximo a los 20 días de la lactancia y después del destete decrece al nivel de la preñez temprana (Fig.13).

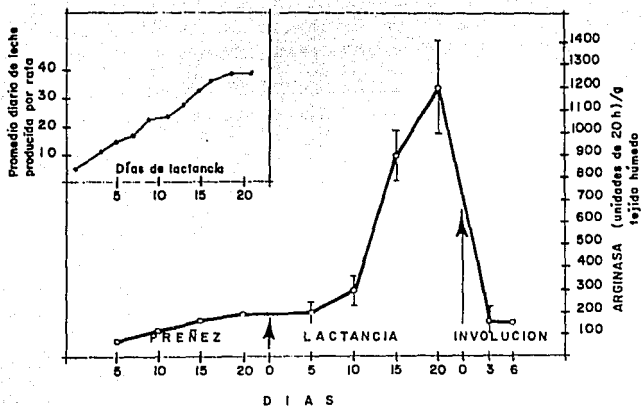


Fig. 13 Variaciones de la actividad de arginasa en la glándula mamaria de la rata. (94)

Las líneas verticales equivalen a dos veces el E.E.M. (error estándar de la media). En donde no se muestra la línea vertical, el E.E.M. es demasiado pequeño para ser mostrado. La gráfica del recuadro representa la curva de lactancia.

Las variaciones en la actividad de fosfatasa alcalina en la glándula mamaria fueron similares al comportamiento de arginasa, mientras que el contenido de esta enzima en el riñón permaneció constante a través de las 3 fases (preñez, lactancia e involución mamaria).

Se observó un aumento del peso de hígado en la preñez tardía y en la lactancia, por arriba del aumento debido al crecimiento general del cuerpo. Esto tiende a resaltar el incremento en la actividad total de arginasa hepática durante la lactancia (Fig 14).

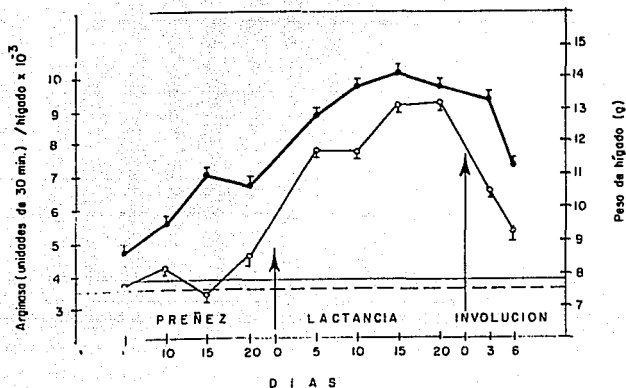


Fig. 14 Variaciones en la actividad total de arginasa hepática y en el peso de hígado, durante la preñez, lactancia e involución. (94)

Los círculos representan la actividad total de arginasa hepática; los puntos negros representan el peso de hígado. La línea horizontal continua es el nivel control de no-preñez para el peso de hígado. La línea horizontal punteada es el nivel control de no-preñez para la actividad total de arginasa hepática. Con el objeto de evitar confusión, cada línea vertical representa la media E.E.M. estándar de la media) en una sola dirección.

Las variaciones en la actividad específica de la arginasa hepática se muestran en la Fig.15. Es interesante notar que el metabolismo materno en la preñez, debido a las necesidades del crecimiento en los fetos, no requiera de un incremento en la actividad de arginasa hepática, mientras que la lactancia evidentemente lo necesita.

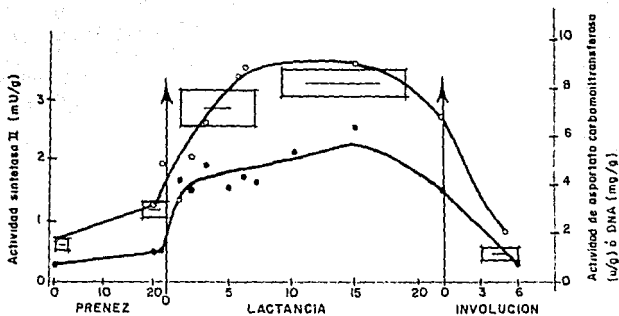


Fig. 15 Variaciones en la actividad específica de arginasa hepática durante la preñez, lactancia e involución. (11)

La línea horizontal punteada es el nivel control de no-preñez. Las líneas verticales equivalen a dos veces el E.E.M. (error estándar de la media).

Los autores sugirieron que la arginasa en la glándula mamaria interviene en la desaminación de aminoácidos (relacionados con la producción de urea), dando lugar a una importante fuente de carbohidratos, requeridos para la síntesis de proteína de la leche.

En 1967, Mephram et al (108) realizaron una comparación cuantitativa entre los aminoácidos absorbidos por la glándula mamaria lactante de cabra y los aminoácidos correspondientes secretados en la proteína de la leche. En este experimento, la glándula mamaria lactante fué difundida con $[U-1^14C]$ L-arginina.

La radioactividad fué detectada en la arginina y prolina de la leche y en la urea, prolina y ornitina del plasma sanguíneo; muy poca actividad fué detectada en el dióxido de carbono y ninguna en la citrulina del plasma.

A partir de estos resultados, los investigadores demostraron que la arginina en la ubre de cabra es dividida para formar urea y ornitina y que esta última, más la ornitina absorbida por la sangre, es usada para la síntesis de prolina. La α -transaminación de ornitina podría conservar el nitrógeno en la forma de glutamato para ser usado en la síntesis de algunos otros aminoácidos.

En 1972, Yip et al (11) demostraron que la glándula mamaria lactante experimenta: a) una considerable formación de ornitina debido a la alta actividad de arginasa; b) una mayor conversión de arginina en prolina; y c) una elevación de la actividad de arginasa en la preñez, alcanzando un valor máximo durante la lactancia tardía y decayendo posteriormente en la involución.

El desarrollo de la actividad de arginasa estuvo acompañado por un aumento paralelo en la actividad de ornitina amino transferasa (Fig.16). El producto de la reacción de esta enzima, el glutamato γ -semialdehído (o α -pirrolina-5-carboxilato), es el precursor inmediato de prolina. La composición enzimática de la glándula mamaria es por lo tanto apropiada para la mayor conversión de arginina en prolina.

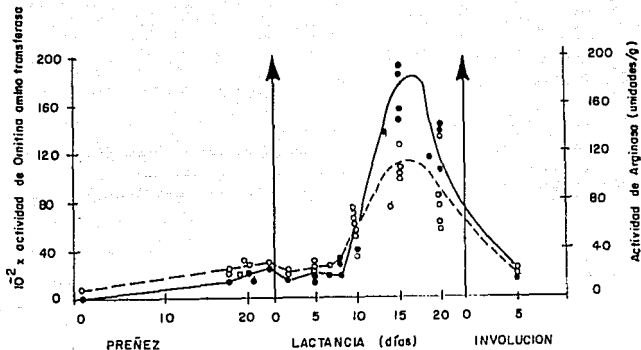


Fig. 16 Desarrollo paralelo de las actividades de arginasa y ornitina amino transferasa en la glándula mamaria de rata durante la lactancia tardía. (11)

Ambas actividades de arginasa (.) y ornitina amino transferasa (o) están expresadas en unidades (mol/min) por g de glándula libre de leche, a partir de animales individuales.

Los autores demostraron que la arginasa en la glándula mamaria no puede funcionar como parte del ciclo de la urea, ya que no se detectó actividad de carbamil fosfato sintetasa (amoníaco) y de ornitina carbamil transferasa. La actividad estuvo asociada sin embargo, con una actividad igualmente grande de la siguiente enzima que conduce a la formación de prolina.

En 1974, Oka y Perry (13) sugirieron que otra función probable de la arginasa en el tejido mamario es la de proveer ornitina para la biosíntesis de espermidina. Esta posibilidad parece especialmente atractiva ya que la concentración de espermidina aumenta marcadamente en el tejido mamario, junto con las actividades de ornitina descarboxilasa y S-adenosil metionina descarboxilasa. En presencia de las últimas dos enzimas, la ornitina formada por la arginasa, puede ser convertida a espermidina a través de la putrescina.

Los estudios realizados sobre el desarrollo de la glándula mamaria "in vitro" han demostrado que la espermidina, junto con la insulina y prolactina, produce un marcado incremento de la síntesis de proteínas de la leche, el cual es similar al producido por la combinación de insulina, glucocorticoide y prolactina.

Otros estudios demostraron que la prolactina, en presencia de insulina, aumenta la actividad de arginasa en el epitelio mamario. Por lo tanto, es probable que la arginasa pueda tener una función crucial en la síntesis de proteína de la leche, participando a través de la biosíntesis de espermidina. Estos estudios no excluyen la función posible para la arginasa en la formación de prolina, como se sugirió anteriormente (108,11).

Los estudios metabólicos de la lactancia son escasos; en esta situación el organismo materno esta sujeto a alteraciones mas marcadas de su balance metabólico que durante la preñez, ya que este tiene que producir grandes cantidades de leche, rica en

proteínas de alta calidad. Esto es parcialmente contrarrestado por adaptaciones anatómicas y una alimentación mas intensa, junto con un aumento en la disposición de urea.

En 1984, Remesar et al (17) midieron la actividad de arginasa en el hígado, intestino delgado, riñón y estómago de ratas preñadas y lactantes. Los patrones observados en la actividad de los tejidos estudiados fueron uniformes, con dos máximos, en el día 19 de la preñez y en el día 30 después del parto (Fig.17).

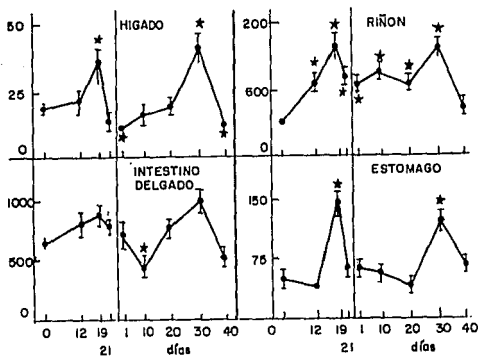


Fig.17 Actividad de arginasa en diferentes tejidos de rata durante la preñez y lactancia (17)

Todos los valores representan la media E.E.M. (error estandar de la media), a partir de 5 a 7 animales diferentes. Las actividades en el riñón, intestino y estómago son expresadas en nKat/g de tejido. La actividad en el hígado esta expresada en Kat/ g de tejido.

Durante la lactancia, se observó un aumento en los niveles de urea en plasma. La alta ingestión de comida por la rata durante la preñez, y especialmente durante la lactancia, resulta en una utilización significativa de aminoácidos para la obtención de energía. Se puede suponer que una parte significativa de su nitrógeno es excretado en forma de urea. Esta alta producción de urea puede ayudar a explicar el aumento observado en la actividad de arginasa, al menos en la lactancia (Fig 17).

Los niveles elevados de actividad de arginasa en la preñez tardía pueden estar relacionados tentativamente al aumento en el glucagon circulante.

Función en el desarrollo embrionario

La presencia de la actividad de arginasa en el útero de ratas adulto fué detectada por Freeman et al (21).

En 1986, Mendez et al (45) estudiaron la actividad de arginasa en sitios de implantación de la rata. La administración intrauterina de varias concentraciones de un análogo sintético de L-ornitina, AIAVA (ácido 2-amino-5-iodo-acetamidovalérico), produjo detención del crecimiento embrionario concomitante con la inhibición de arginasa. El efecto de AIAVA puede ser específico ya que este no produjo una inhibición significativa de la actividad de ornitina descarboxilasa. Estos resultados sugirieron que la arginasa participa de manera importante en el proceso de embriogénesis.

Función en el cerebro

Se ha sugerido que a la arginasa del tejido cerebral no se le puede asignar una función en el ciclo de la urea ya que dos enzimas, la carbamil fosfato sintetasa y la ornitina carbamil trasferasa, se encuentran presentes en cantidades extremadamente bajas (30).

Sadasivudu et al (34) compararon la distribución de algunas de las enzimas involucradas en la disposición metabólica de arginina y ornitina, en diferentes regiones del cerebro (Tabla 51).

El cerebro puede efectuar la síntesis de arginina a partir de citrulina. El destino de la arginina depende de la actividad de dos enzimas, arginasa y transamidinasa. La arginina es también utilizada para la síntesis de proteína. La arginasa y transamidinasa producen ornitina a partir de arginina además de urea y compuestos guanido. Como la producción de urea en el cerebro es cuantitativamente insignificante y como en este, la conversión de ornitina a citrulina no ocurre, la función probable para estas dos enzimas es la producción de ornitina, cuyo destino en el cerebro aun no es bien entendido. Sin embargo, la ornitina puede experimentar transaminación con el α -cetoglutarato, y originar un aumento en el ácido glutámico a través de la formación de semialdehído glutámico. En este proceso de transaminación, ambos reactantes son convertidos en ácido glutámico. La ornitina también puede tomar parte en la reacción con glioxalato. Otro importante destino para la ornitina es la

conversión a putrecina, por descarboxilación. Se ha demostrado que la actividad de ornitina descarboxilasa está presente en el cerebro de rata en desarrollo.

Tabla 51. Distribución de las actividades de arginasa *, transaminasa ** y ornitina aminotransferasa *** en diferentes regiones del cerebro de rata. (34)

Enzima	Cerebelo	Tallo cerebral	Corteza
-Arginasa:	33.33 ± 3.4 (11)	12.46 ± 3 (11)	16.036 ± 3.5 (11)
-Transaminasa (arginina-glicina):	0.56 ± 0.096 (10)	0.723 ± 0.2157 (9)	0.735 ± 0.344 (10)
-Transaminasa (arginina-GABA):	0.481 ± 0.063 (5)	0.676 ± 0.265 (5)	0.60 ± 0.075 (5)
-Ornitina amino- transferasa (α-cetoglutarato):	0.40 ± 0.071 (6)	0.27 ± 0.079 (6)	0.24 ± 0.073 (6)
-Ornitina amino- transferasa (glioxalato):	0.136 ± 0.077 (3)	0.196 ± 0.089 (3)	0.32 ± 0.014 (3)

* μmol de urea formada/h/g de tejido.

** μmol de ornitina formada/h/g de tejido.

*** μmol de L-pirrolidina-5-carboxilato formada/min/g de tejido. La actividad de transaminasa fue estimada utilizando arginina como sustrato y la glicina y ácido gamma aminobutírico (GABA) se utilizaron como aceptores del grupo guanido. Para la actividad de ornitina aminotransferasa se utilizó ácido α-cetoglutarico y ácido glioxálico como aceptores del grupo amino. Cada valor representa la media ± D.E. (desviación estándar). Los números en los paréntesis indican la cantidad de animales usados.

La distribución de la actividad de ornitina amino transferasa (α -cetoglutarato) fué variable en las diferentes regiones del cerebro, y su cantidad fué aproximadamente paralela a la actividad de arginasa. De esta manera, la elevada actividad de ornitina amino transferasa (alfa-cetoglutarato) puede estar correlacionada con la alta actividad de arginasa en el cerebelo. Esto también podría sugerir que el destino principal del esqueleto de arginina es el de dar un aumento en el ácido glutámico, vía arginasa y ornitina amino transferasa. Como resultado de esta reacción de transaminación entre ornitina y α -cetoglutarato, ambos nitrógenos γ - y α -amino son conservados en la forma de ácido glutámico.

En una investigación posterior, Sadasivudu et al (93) estudiaron la distribución de arginino succinato sintetasa, arginino succinato liasa y arginasa, y la síntesis de urea en el cerebelo, corteza y tallo cerebral (Tabla 52).

De las tres regiones del cerebro, el cerebelo tuvo la mayor actividad de arginasa. Esta elevada actividad puede contribuir más que nada a la formación de ornitina. La corteza cerebral tuvo niveles elevados de la actividad de arginino succinato sintetasa y arginino succinato liasa, y una alta capacidad de sintetizar urea a partir de ácido aspártico y citrulina.

El amoníaco producido por el cerebro durante la acción neuronal está disponible principalmente en forma de glutamina. Este estudio confirmó que la producción de urea (Tabla 51), procedió principalmente a partir de citrulina, cuya síntesis en

el cerebro fué casi nula debido a que no se detectó actividad de ornitina carbamil transferasa. Las pequeñas cantidades de citrulina en el cerebro pudieron ser derivadas a partir de la sangre.

Tabla 52. Actividades de arginino succinato sintetasa, arginino succinato liasa y arginasa y síntesis de urea en diferentes regiones del cerebro de rata. (93)

	Actividad ($\mu\text{mol/h/g}$ de tejido)		
	Cerebelo	Corteza	Tallo cerebral
-Arginino succinato sintetasa:	7.6 \pm 2.8 (12)	8.6 \pm 1.3 (12)	6.0 \pm 2.2 (12)
-Arginino succinato liasa:	3.3 \pm 1.7	5.6 \pm 2.0	4.9 \pm 2.6
-Arginasa:	33.3 \pm 3.4 (22)	16.0 \pm 3.8 (22)	12.5 \pm 3.0 (22)
-Síntesis de urea:	5.7 \pm 2.6 (16)	7.3 \pm 2.1 (16)	6.0 \pm 2.9 (16)

Cada valor representa la media \pm D.E. (desviación estandar). Los números en los paréntesis indican la cantidad de animales usados.

La formación de cantidades apreciables de ornitina sin la formación neta de citrulina a partir de arginina, indica que en el cerebro la arginina puede ser convertida en ornitina pero no la ornitina en citrulina. Estos resultados indican que el metabolismo de estos tres aminoácidos esta relacionado en una manera unidireccional (citrulina \rightarrow arginina \rightarrow ornitina) y que la ornitina no puede ser convertida en el ciclo de la urea. La ar-

ginina no solo es un precursor de la urea sino también de ciertos compuestos guanido biológicamente importantes. Estos compuestos son formados por la acción de transamidinasa y son utilizados para la síntesis de proteínas.

Función en la piel

La actividad de arginasa se encuentra presente en el tejido epidérmico normal, y es elevada en muchas enfermedades asociadas con la hiperplasia epidérmica e hiperqueratinización. La elevada actividad de arginasa epidérmica es encontrada en la psoriasis, verruga vulgaris, ictiosis, epidermis plantar y papiloma Shope (62). A excepción de la arginasa, las enzimas asociadas con el ciclo de la urea no han sido encontradas en el tejido epidérmico. Los hidrocarburos alicíclicos parecen inducir cambios morfológicos y aumentar la actividad de arginasa en la piel de ratón (62), y en la piel de cuyo (163).

Cotton y Mier (133) demostraron que existe estimulación de la proliferación epidérmica como resultado de las heridas. Esta estimulación es precedida por la inducción de la actividad de ornitina descarboxilasa y la producción de putrescina y espermidina, bajo la influencia del factor epidérmico de crecimiento. De esta manera, los autores sugirieron que la función de la arginasa epidérmica es la de proveer una reserva de ornitina para la producción de espermidina.

Verma et al (9) estudiaron el efecto del agente promotor de tumores, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) sobre la

actividad de arginasa epidérmica. La aplicación de TPA 10 nmol en la piel de ratón no ocasionó un aumento de la actividad de arginasa en ninguna de las fracciones (soluble y particulada), durante un periodo de 24 h. En contraste, hubo un aumento grande de la actividad de ornitina descarboxilasa en la fracción soluble después de 4.5 h del tratamiento. La actividad de ornitina descarboxilasa en la epidermis de ratón fué mucho menor que la actividad de arginasa y estuvo predominantemente localizada en la fracción soluble. Estos resultados indican que el nivel normal de la actividad de arginasa no es un factor limitante para la estimulación de la biosíntesis de poliaminas por TPA.

Los investigadores sugirieron que la actividad de arginasa en la epidermis de ratón puede desempeñar una función en proveer ornitina para la biosíntesis de poliaminas, y en la producción de glutamato y prolina, así como en la producción de proteínas queratinosas.

Función en la glándula tiroide

La actividad de arginasa en la glándula tiroide de rata es muy baja, siendo aproximadamente mil veces menor a la del hígado, en relación al peso húmedo. Esta glándula no contiene actividad detectable de las otras enzimas que intervienen en el ciclo de la urea (23).

Varios estudios han demostrado que en la glándula tiroide, la acumulación de poliaminas esta estrechamente relacionada con la formación del bocio y con el crecimiento neoplásico. La

biosíntesis de poliaminas en la tiroide esta regulada principalmente por la hormona tirotropina (TSH). La actividad de ornitina descarboxilasa responde rápida y marcadamente al cambio en la TSH circulante. Aunque se ha pensado que la ornitina descarboxilasa es la enzima de velocidad limitante en la biosíntesis de poliaminas, es también posible que la velocidad de formación de putrescina dependa de la concentración celular de ornitina.

Matsuzaki et al (23) estudiaron el efecto de la droga anti-tiroidea, metiltiouracil (MTU) sobre la actividad de la arginasa en la tiroide de rata. El tratamiento crónico con MTU ocasionó un aumento en los niveles de TSH circulante. La actividad de arginasa aumentó significativamente a los 15 días del tratamiento y una inyección de L-tiroxina (T) suprimió el incremento de la actividad de arginasa y del nivel de TSH en suero. Esto demuestra que la actividad de arginasa esta relacionada a la TSH circulante. La concentración tiroidea de poliaminas fué aumentada por la acción del MTU y fué disminuida por T, con la excepción de espermina. Después del tratamiento con MTU, la concentración tiroidea de arginina fué disminuida significativamente, mientras que la concentración de ornitina permaneció sin cambio. La T inyectada a las ratas pretratadas con MTU, restauró la concentración disminuida de arginina al nivel normal. Estos resultados sugirieron que la arginasa tiroidea sirve para proveer suficiente ornitina como sustrato para la síntesis de putrescina.

Arginasa en el hombre; activación e inmovilización.

La activación de la arginasa con iones metálicos divalentes, especialmente con Mn^{+2} , es un hecho bien documentado (85). Sin embargo, la función exacta del ión metálico en la actividad catalítica de la enzima no se ha establecido claramente.

Carvajal et al (43) estudiaron el efecto del Mn^{+2} sobre la estructura cuaternaria de la arginasa de hígado humano y relacionaron este efecto con la actividad enzimática.

La arginasa purificada de hígado humano fué activada completamente por incubación con $Mn^{+2}Cl$ 1 mM en Tris-HCl 5 mM, pH 7.5, durante 30 min a 37°C. El peso molecular de la enzima determinado por filtración en gel sobre columnas de Sefadex G-200, fué de 118,000 Daltones. Este valor es similar al peso molecular reportado para la arginasa de hígado de rata (68).

La incubación de la arginasa de hígado humano a 37 °C con EDTA 30 mM, seguida por una diálisis exhaustiva (con agua bidestilada), resultó en una enzima completamente inactivada con un peso molecular de aproximadamente 30,000. Esto demuestra que la arginasa nativa esta compuesta por cuatro subunidades. La adición de Mn^{+2} a las subunidades inactivas resultó en la regeneración de la actividad enzimática. El peso molecular estimado para la enzima regenerada fué el mismo que el de la enzima nativa. La enzima nativa y las subunidades difirieron en su comportamiento sobre cromatografía de intercambio iónico y en el isoelectroenfoque.

En 1976, Carvajal et al (20) inicialmente inmovilizaron la

arginasa de hígado humano mediante la unión a nylon y con glutaraldehído como agente de entrecruzamiento.

La incubación de la enzima tetramérica (inmovilizada) con EDTA seguida por diálisis, ocasionó la disociación de la enzima en subunidades inactivas unidas a la matriz y en subunidades solubilizadas. Ambas especies recuperaron la actividad enzimática después de la incubación con Mn^{+2} , y la actividad de las subunidades reactivadas unidas a la matriz fué aproximadamente 25 % de la actividad mostrada por la enzima inicialmente unida al soporte en la forma tetramérica (Tabla 53). Este valor sugiere que el tetrámero estuvo enlazado a la matriz vía subunidad simple y que por lo tanto las subunidades reactivadas, unidas a la matriz representan monómeros de arginasa.

Tabla 53. Tratamiento del tetrámero inmovilizado de arginasa con EDTA. (20)

Condiciones	Actividad enzimática (unidades totales)			
	Proteína enlazada		Proteína solubilizada	
	Sin Mn^{+2}	Con Mn^{+2}	Sin Mn^{+2}	Con Mn^{+2}
-Antes del tratamiento:	3.36	3.37	----	----
-Después del tratamiento:	0.00	0.36	0.00	2.18

Las actividades enzimáticas fueron ensayadas tanto en ausencia de Mn^{+2} como después de la activación con $MnCl_2$, 5 mM en Tris-HCl (pH 8.7) a 37°C durante 20 min. La concentración de sustrato fué 100 mM y la solución de amortiguador fué glicina-NaOH 50 mM (pH 9.5). Una unidad de enzima = 1 μ mol de urea formada/min a 37°C.

Cuando las subunidades reactivadas unidas al soporte fueron incubadas con subunidades solubles en presencia de Mn^{+2} , ellas "recogieron" de la solución una cantidad de proteína y actividad enzimática casi idéntica a la inicialmente perdida por el tetrámero inmovilizado después del tratamiento con EDTA.

Para obtener información sobre las propiedades de la enzima inmovilizada, los valores de K_m para arginina fueron determinados. A partir de los datos presentados en la Fig. 18 el mismo valor (4 mM) fué calculado para el tetrámero unido, para las subunidades reactivadas unidas y para la enzima reasociada unida. El mismo valor fué obtenido para la enzima soluble y este concuerda con el valor reportado por Bascur et al (90).

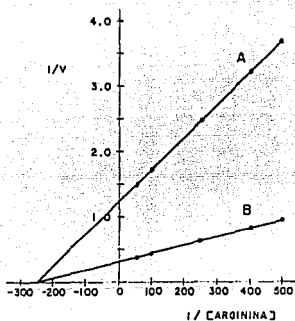


Fig. 18 Dependencia de la actividad de arginasa sobre concentración de arginina. (20)

A, subunidades reactivadas unidas; B, tetrámero inmovilizado. La velocidad está expresada como mol de urea formada/min y las concentraciones de arginina en unidades molares. Con la enzima reasociada unida a la matriz, los resultados fueron casi exactamente los mismos que los mostrados para el tetrámero inmovilizado.

A partir de los resultados, los autores sugirieron que la reactivación de las subunidades de arginasa involucra la formación de un monómero activo, el cual entonces adquiere la conformación que favorece una reasociación al estado tetramérico. Los experimentos corroboraron la conclusión de que el manganeso desempeña una función en el mantenimiento de la estructura cuaternaria de la arginasa de hígado humano (43). Este estudio también demostró que los efectos estructurales y activantes del Mn^{+2} sobre la arginasa pueden ser analizados como fenómenos separados.

En 1978, Carvajal et al (80) examinaron con mas detalle las propiedades enzimáticas de la arginasa de hígado humano en diferentes estados de agregación. La incubación de la arginasa soluble con p-hidroximercuribenzoato (PHMB) resultó en la disociación de la enzima en dímeros activos. La adición de 2-mercaptoetanol dió como resultado la regeneración de la enzima tetramérica. Cuando la arginasa, unida covalentemente al nylon, fué incubada con p-hidroximercuribenzoato, se obtuvieron dímeros unidos a la matriz. La incubación de estas especies con 2-mercaptoetanol resultó en la formación de dímeros estables, no modificados (Fig.19). Basados en estas observaciones de la disociación de la arginasa, se sugirió un modelo de simetría-D para la enzima de hígado humano.

La actividad específica, el valor de K_m para arginina, el pH óptimo y las constantes de inhibición para ornitina y lisina fueron determinadas para las fomas monomérica, dimérica y tetramérica. Los resultados se muestran en la Tabla 54.

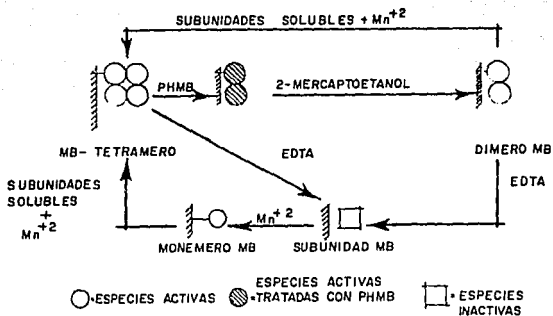


Fig. 19 Esquema que representa la relación entre los derivados unidos a la matriz (U.M.) de la arginasa de hígado humano (80)

Tabla 54. Propiedades enzimáticas de los monómeros, dímeros y tetrameros de arginasa unidos a la matriz. (80)

Derivado unido a la matriz	K_m (mM)	Lisina, K_i (mM)	Ornitina, K_i (mM)	pH óptimo
Monómeros	4.0	2.2	4.1	9.5
Dímeros	4.0	2.4	4.3	9.5
Tetrameros	4.0	2.3	4.2	9.5

Para determinar la constante de Michaelis, la concentración de arginina fué variada desde 2 a 20 mM. Para los valores de K_i , la concentración de lisina y ornitina fué variada desde 2 a 20 mM y las concentraciones de arginina fueron 2, 5, 10 y 20 mM. Los valores de K_i fueron determinados por métodos gráficos. La solución de amortiguador usada en los experimentos cinéticos fué glicina-NaOH 50 mM (pH 9.5). Para el pH óptimo, la solución de amortiguador usado fué: Tris-HCl 50 mM (pH 7.0 a 8.7) y glicina-NaOH 50 mM (pH 8.7 a 10.0)

Los mismos valores que se presentan en la Tabla 54 fueron calculados para los tetrámeros reasociados obtenidos mediante la incubación de monómeros o dímeros unidos a la matriz con subunidades solubles en presencia de Mn^{+2} . Estos valores también concuerdan con los reportados para la enzima soluble (90).

Los autores concluyeron que la conducta de los sitios activos de los monómeros no es substancialmente alterada por la interacción de estas especies en la molécula oligomérica. Los monómeros de arginasa de hígado humano presentan la misma actividad y tienen características cinéticas iguales independientemente si estos existen simples o como parte de una estructura oligomérica. Estos estudios en los que se utilizaron especies unidas a la matriz, revelan que a pH 9.5, las interacciones de subunidad parecen no tener efecto en los aspectos catalíticos de la arginasa de hígado humano. Por lo tanto, como con otras enzimas oligoméricas que no muestran cooperatividad a pH 9.5, el significado de la estructura tetramérica de la arginasa está por determinarse. Una posibilidad interesante es que la estructura cuaternaria de la arginasa sea requerida para interactuar con otras enzimas funcionalmente asociadas. Una interpretación de este tipo ocurre en *Saccharomyces cerevisiae* (100) y provee un mecanismo regulatorio "epi-enzimático", el cual es mediado por el enlace estequiométrico de la ornitina carbamil transferasa con arginasa. En las células del hígado, la compartimentación de las enzimas del ciclo de la urea previene la integración física de estas dos enzimas. Sin embargo es posible una interacción de

la arginasa con las enzimas del citosol involucradas en la formación de arginina a partir de citrulina.

La reacción catalizada por la arginasa de hígado humano ha sido estudiada generalmente a pH 9.5. A este pH, que es el óptimo para la enzima, las cinéticas hiperbólicas fueron observadas hasta en presencia de aminoácidos inhibidores (15,90).

En 1981, Carvajal et al (41) demostraron que las cinéticas de reacción de la arginasa de hígado humano, en términos de concentración de arginina, son alteradas por variación del pH. Al disminuir el pH óptimo (9.5) hacia un valor más fisiológico (7.5), hay una transición de las cinéticas hiperbólicas a las cinéticas sigmoidales.

- a) Estudios con la arginasa soluble. La Fig. 20 muestra los resultados obtenidos cuando la reacción catalizada por arginasa fué estudiada a pH 7.5 en presencia y ausencia de ornitina. Se observa que las líneas en la gráfica de doble recíproco son más bien curvadas que lineales y todas ellas se cruzan en un punto de intersección común del eje $1/V$. La inhibición por ornitina es entonces competitiva y una cooperatividad positiva para el sustrato es aparente a este pH.

El p-hidroximercuribenzoato disocia a la arginasa en dímeros activos que se reasocian cuando el reactivo es removido con 2-mercaptoetanol (80). La Fig. 21 muestra que la arginasa dimerica, químicamente modificada exhibe cinéticas hiperbólicas in-

-clusivo en presencia del producto. Como ocurre con la enzima nativa, las especies reasociadas mostraron cinéticas sigmoidales.

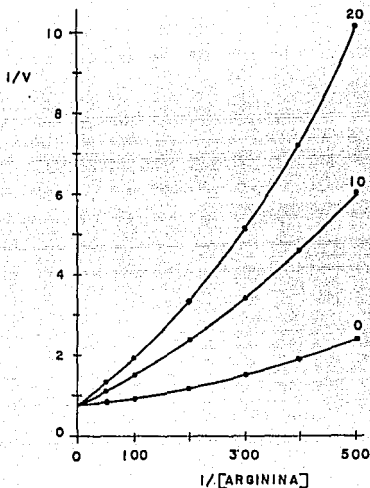


Fig. 20 Inhibición de la arginasa nativa por ornitina a pH 7.5. (41)

La velocidad es expresada como mol de urea formada/min y las concentraciones de arginina en molaridad. Los números sobre las líneas expresan las concentraciones de ornitina en unidades milimolar.

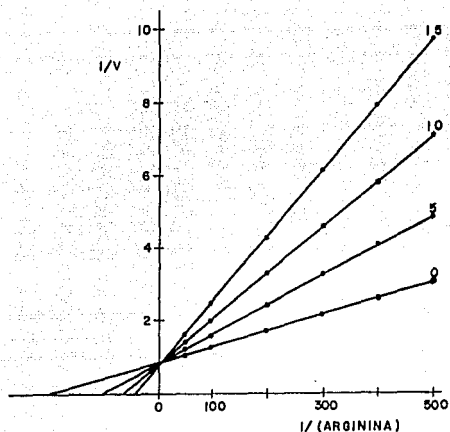


Fig. 21 Inhibición de la arginasa dimerica por ornitina a pH 7.5 (41).

La enzima nativa fué tratada con p-hidroximercuribenzoato para obtener los dímeros. La velocidad es expresada en mol de urea formada/min y las concentraciones de arginina en molaridad. Los números sobre las líneas expresan la concentración de ornitina en unidades milimolares.

- b) Estudios con la enzima inmovilizada. La arginasa inmovilizada fué usada para analizar la conducta cinética de los dímeros no modificados. Para este propósito, la arginasa tetramérica inmovilizada fué disociada con p-hidroximercuribenzoato y despues el reactivo bloqueador fué removido con 2-mercaptoetanol. La transición de los tetrámeros en dímeros estuvo asociada con un cambio de las cinéticas

sigmoidales a las hiperbólicas a pH 7.5. La conducta cinética de los dímeros fué la misma antes y después de la adición de 2-mercaptoetanol.

En contraste con los resultados obtenidos a pH 9.5, se observó que una cooperatividad positiva es aparente en la acción de la arginasa a pH 7.5. La conducta cinética a pH 7.5 esta relacionada al estado estructural de la enzima. En efecto, cuando la arginasa es disociada en dímeros hay una transición de las cinéticas sigmoidales a las hiperbólicas.

Los estudios del control de enzimas oligoméricas han enfatizado la importancia de las interacciones de subunidad. Una evidencia útil para indicar que semejantes efectos estan involucrados, es el cambio de las cinéticas alostéricas a la función hiperbólica mas común cuando los cambios estructurales son inducidos en la enzima. Los resultados obtenidos con la arginasa disociada por p-hidroximercuribenzoato son entonces una indicación de que las interacciones de subunidad podrían desempeñar un papel en los aspectos funcionales de la enzima.

Los efectos del tipo alostérico han sido también sugeridos para la arginasa de otras fuentes. Kaysen y Strecker (72) encontraron que la arginasa de riñón de rata es activada por altas concentraciones de arginina y que la activación desaparece en presencia de lisina. A partir de estas observaciones, ellos sugirieron un segundo sitio de unión para la arginina y ciertos aminoácidos que cuando lo ocupan modifican el sitio catalítico el cual es dependiente del pH. Bedino (190) observó que en la

presencia de ornitina, la arginasa de hígado de bovino muestra cinéticas sigmoidales y sugirió la regulación alostérica de la enzima por el producto. En contraste con la arginasa de hígado humano, la enzima de hígado de vaca muestra cinéticas sigmoidales a pH 9.5 y solo en la presencia de ornitina. Las diferentes fuentes de enzima pueden explicar estas diferencias y las encontradas con la arginasa de riñón de rata. En cualquier caso, es claro que los efectos del tipo alostérico pueden ser significativos en los aspectos catalíticos de la arginasa.

En un estudio posterior, Carvajal et al (149) demostraron que es posible obtener dímeros híbridos (inmovilizados) a partir de la arginasa de hígado humano. La actividad de los monómeros de la arginasa unidos a la matriz no fué modificada por la incubación con p-hidroximercuribenzoato. Cuando los monómeros unidos a la matriz, químicamente modificados se incubaron con subunidades solubles en presencia de Mn^{+2} , los dímeros fueron obtenidos. Estos dímeros fueron híbridos entre los monómeros nativos y los modificados (Fig.22). Los resultados obtenidos concuerdan con una simetría-D en donde dos dímeros se unen para formar una enzima tetramérica.

Los estudios cinéticos de los derivados diméricos fueron desarrollados a pH 9.5, el óptimo para todas las especies. No se observó diferencia entre los dímeros unidos a la matriz con respecto al valor de K_m para arginina y las constantes de inhibición para ornitina y lisina. Los valores obtenidos fueron iguales a los reportados anteriormente para los monómeros, dí-

meros y tetrámeros no modificados (80). Por lo tanto, es claro que la estructura de los sitios activos de la arginasa no es alterada por modificación química con p-hidroximercuribenzoato.

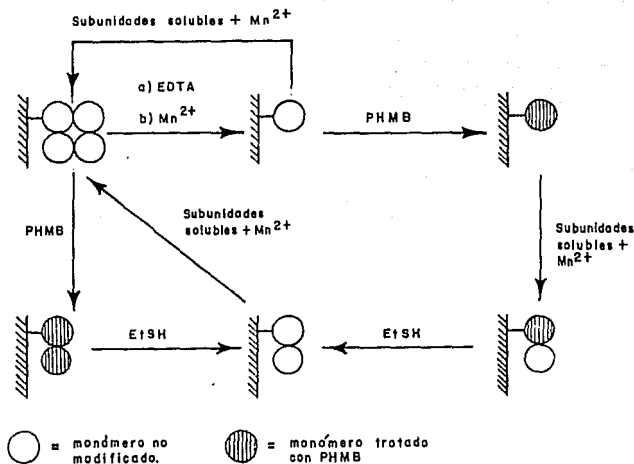


Fig. 22 Esquema que representa la preparación de derivados diméricos unidos a la matriz de la arginasa de hígado humano. (149)

PHMB = p-hidroximercuribenzoato; EtSH = 2-mercaptoetanol.

Arginasa en el hígado y eritrocitos.

En 1960, Cabello et al (96) purificaron parcialmente la arginasa de eritrocitos humanos y estudiaron sus propiedades cinéticas en comparación con las de la preparación purificada de hígado humano. La producción y pureza de las preparaciones de ambas enzimas se muestra en la Tabla 55.

Tabla 55. Producción y pureza de las preparaciones de arginasa a partir del hígado y eritrocitos humanos. (96)

Fuente	Act. total	Act. específica	Producción	Purificación relativa
	unidades	unidades/mg	(%)	(veces)
-Eritrocitos	49	5.55	6	426
-Hígado	11,800	151.60	49	77

La concentración de sustrato en la mezcla de incubación fué 0.04 M. El pH durante la reacción se mantuvo a 9.1 para asegurar la estabilidad enzimática. Una unidad de arginasa es definida como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de urea/min a 37°C.

Los resultados de los experimentos cinéticos para ambas preparaciones de arginasa se describen a continuación:

- Velocidad de reacción. Bajo las condiciones del ensayo la velocidad de reacción fué constante hasta que aproximadamente 10 % de la cantidad de sustrato fué hidrolizada.

Este hecho puede ser explicado por el efecto inhibitorio de la ornitina producida durante la reacción. El mismo porcentaje de hidrólisis fué alcanzado cuando se añadieron cantidades adicionales de sustrato a la mezcla de reacción bajo un periodo de 1 h, indicando que la inactivación de la enzima no ocurre durante la reacción. Esto fué demostrado con ambas preparaciones de hígado y eritrocitos.

- b) Curvas de actividad-pH. Las actividades de arginasa de hígado y eritrocitos fueron exploradas llevando a cabo la reacción con soluciones de amortiguador de fosfato y glicina 0.1 M en un rango de pH 4.5-12.5. Las curvas de actividad-pH exhibieron la misma forma asimétrica para ambas preparaciones (Fig. 23). La actividad máxima fué detectada a pH 10.0-10.2.

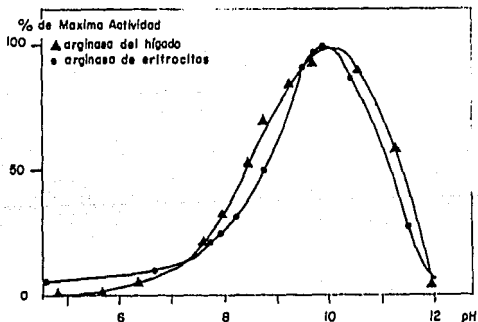


Fig. 23 Efecto del pH sobre la actividad de la arginasa de eritrocitos y de hígado humano. (96)

- c) Estabilidad. Ambas preparaciones enzimáticas exhibieron estabilidad similar entre pH 7.0 y pH 10.0.
- d) Influencia de la concentración de sustrato. La concentración de sustrato fué variada entre 4 y 40 mol/ml de mezcla de incubación. Las curvas de velocidad vs concentración de sustrato fueron del tipo hiperbólico común. Los valores de K_m (determinados a partir del método gráfico de lineweaver-Burk) a pH 9.1 fueron:
5.7 mM para la preparación de arginasa hepática y 5.3 mM para la preparación de arginasa de eritrocitos.
- e) Energía de activación. La actividad de las preparaciones de arginasa de hígado y de eritrocitos fué medida a 0, 20 y 37°C a pH 9.1. La energía de activación fué determinada por el método gráfico derivado a partir de la ecuación de Arrhenius. Se encontraron valores similares para ambas preparaciones enzimáticas: 9,962 cal para la arginasa de hígado y 9,537 cal para la arginasa de eritrocitos.
- f) Activación por cationes divalentes. Los iones manganeso y cobalto activaron a las enzimas de hígado y eritrocitos. En ambos casos, el Mn^{+2} fué más eficiente en la activación.

Los resultados demostraron que las características cinéticas de la arginasa de hígado y eritrocitos son muy similares. Esto sugirió que la misma enzima fué obtenida a partir de la sangre y del hígado.

En 1965, Cabello et al (88) realizaron estudios de inmunodifusión y de movilidad electroforética de las arginasas de hígado y eritrocitos humanos. Los resultados de esta investigación se resumen en los siguientes puntos:

1. Las preparaciones purificadas de arginasa de hígado (116 U/mg) y de eritrocitos (4 U/mg) inyectadas a los conejos causaron la formación de anticuerpos que precipitan la actividad enzimática en los antígenos homólogos y heterólogos. La actividad enzimática no fué modificada por estos anticuerpos.
2. Los experimentos de doble difusión en agar sugieren una identidad total de las proteínas enzimáticas en ambos antígenos cuando ellos reaccionan con antisuero-E (suero inmune preparado por inyección del antígeno de los eritrocitos), pero solo una identidad parcial cuando ellos reaccionan con el antisuero-H (suero inmune preparado por inyección del antígeno de hígado).
3. Dos fracciones de proteína enzimática, con cargas catiónicas a pH 8.6, fueron separadas por electroforesis en los antígenos de hígado y eritrocitos. La fracción más rápida (R) tuvo una actividad específica de 120-200 U/mg en las preparaciones de hígado y de 12-66 U/mg en las preparaciones de eritrocitos e incluyó 90-95 % de la actividad total de arginasa. La fracción más lenta (L) tuvo una actividad específica de 2-9 U/mg en las preparaciones

de hígado y de 0.3-1.2 U/mg en las preparaciones de eritrocitos. Las fracciones R y L en cada antígeno fueron precipitadas por los anticuerpos del antisuero-H. En el antisuero-E hubo suficientes anticuerpos precipitantes contra el componente L pero no contra el R.

La comparación de los desplazamientos electroforéticos, y las reacciones inmunoquímicas de las proteínas de migración rápida y lenta indicaron la presencia de dos isoenzimas correspondientes y probablemente idénticas en ambas preparaciones de arginasa purificada.

En 1966, Bascur et al (90) realizaron estudios sobre las formas moleculares de la arginasa de hígado humano. Los resultados obtenidos a partir de este estudio fueron los siguientes:

1. Análisis cromatográfico.

(a) La arginasa purificada (116 U/mg) fué resuelta sobre CM-celulosa en dos picos de actividad y 55 a 60 % de la actividad original fué recuperada. La primera fracción emergió en el frente del amortiguador (Tris-HCl 5 mM, pH 7.4) y contuvo 5 a 10 % de la actividad recuperada. La segunda fracción con 90-95 % de la actividad de arginasa, fué eluida con KCl 0.10-0.14 M.

La recromatografía de los picos aislados bajo las mismas condiciones resultó en patrones de elución reproducibles. Cada una de las fracciones fué homogénea y retuvo sus características de adsorción-elución.

2. Propiedades de las fracciones enzimáticas.

- (a) Afinidad por el sustrato. La afinidad de cada fracción enzimática por canavanina y arginina se muestra en la Tabla 56. Las constantes de Michaelis no manifestaron diferencias significativas.
- (b) Estabilidad al calor. El progreso de la inactivación a 60°C para cada fracción, diluida a la misma actividad y contenido de proteína, fué el mismo.
- (c) pH óptimo. Ambas fracciones alcanzaron actividades óptimas a pH 9.4-9.5.
- (d) Estabilidad al pH. La fracción I fué más resistente al pH ácido que la fracción II. Después de 1 h a pH 5.0 y a pH 6.0, la fracción I retuvo, respectivamente, 78 y 93 % de su actividad, mientras que la fracción II retuvo sólo 54 y 67 %.

Tabla 56. Constantes de Michaelis y de inhibición para las fracciones de arginasa de hígado humano. (90)

Fracción de enzima	Km (mM)		Ki (mM)	
	Arginina	Canavanina	Lisina	Ornitina
I	7.4	44.5	7.1	3.1
II	6.2	26.6	2.5	5.8

Las fracciones fueron activadas con Mn^{2+} 2.6 mM durante 60 min a 37°C. Mezclas de reacción: En 2.5 ml: arginina 40 mM, glicina 40 mM, Mn^{2+} 1 mM, solución de enzima 0.5 ml, pH 9.0, incubada durante 10 min a 37°C. En los experimentos de inhibición se adicionaron lisina 40 mM u ornitina 40 mM y la arginina fué variada de 13 a 80 mM.

(e) Inhibidores. La lisina fué un inhibidor competitivo para ambas fracciones de arginasa, especialmente con la fracción II. La ornitina inhibió competitivamente a la fracción I, pero causó una inhibición de tipo mezclado en la fracción II. La canavanina fué hidrolizada a 10 % de la velocidad de hidrólisis de la arginina.

Estos resultados confirmaron la existencia de dos formas moleculares de la arginasa de hígado humano. Las dos fracciones difirieron en sus estabilidades al pH y en el grado y tipo de inhibición causada por aminoácidos básicos.

En 1978, Beruter et al (15) purificaron y determinaron las propiedades de la arginasa de hígado y eritrocitos humanos. El proceso de purificación utilizado para ambas enzimas se muestra resumido en la Tabla 57.

En contraste con los resultados obtenidos por cromatografía en CM-celulosa (90), se observó que ambas arginasas de hígado y eritrocitos fueron eluidas como picos simples en DEAE-celulosa. El uso de 2-mercaptoetanol durante el proceso de purificación de las enzimas de hígado y eritrocitos pareció inhibir la formación de isoenzimas.

Las preparaciones de hígado y eritrocitos obtenidas a partir del sexto paso de purificación (Tabla 57) dieron una banda simple de proteína que migró hacia el ánodo después de la electrofóresis en gel de poliacrilamida a pH 8.3. Esta banda correspondió a la actividad de arginasa después de la extracción del gel. Se sugirió que el 2-mercaptoetanol tuvo una influencia

Tabla 57. Purificación de la arginasa de hígado y eritrocitos humanos. (15)

Proceso	Proteína total (mg)	Act. total unidades	Act. específica unidades/mg	Purificación relativa (veces)
(a) Hígado:				
1. Homogenizado	55000	225000	5.0	---
2. Calentamiento a 80°C	11800	413000	34.9	7
3. Acetona	5150	206000	40.0	8
4. (NH ₄) ₂ SO ₄	1170	146000	125	25
5. DEAE-Celulosa	85	20300	238	48
6. Sefadex G-200	22.5	47000	2090	418
(b) Eritrocitos:				
1. Extracto	521300	33480	0.053	---
2. Acetona	192900	24300	0.125	2.4
3. Calentamiento a 80°C	10980	16638	1.51	28.5
4. (NH ₄) ₂ SO ₄	110	3027	27.50	520
5. DEAE-Celulosa	3.3	56	16.90	320
6. Sefadex G-200	0.8	10	12.20	230

Una unidad de actividad de arginasa es definida como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de urea/min a 37°C. Las enzimas del sexto paso de purificación alcanzaron una actividad máxima en presencia de solución de amortiguador pH 9.1-9.5 y MnCl₂ 2mM.

sobre las propiedades electroquímicas de las enzimas aisladas. El agente reductor puede prevenir la oxidación de la enzima nativa durante la purificación y así decrecer la formación de múltiples formas activas.

La incubación de la arginasa hepática pura a pH 8.0 en presencia de iones Mn²⁺, produjo una nueva forma de arginasa. En la

electroforesis a pH 8.3, la nueva forma migró hacia el cátodo. Estos resultados demuestran la posibilidad de que las isoenzimas de arginasa puedan ser formadas durante el proceso de aislamiento.

La arginasa de hígado mostró un peso molecular de 107,000 determinado por filtración en gel y un coeficiente de sedimentación de 5.9 S. El tratamiento de la enzima con 25 % de dodecil sulfato de sodio a pH 10.0 causó la disociación en subunidades con pesos moleculares de 35,000. Las propiedades cinéticas determinadas para la arginasa de hígado purificada mostraron un pH óptimo de 9.3 y una concentración óptima de $MnCl_2$ de 2 mM. La K_m para la L-arginina fué 10.5 mM y para la L-canavanina fué 50 mM. La L-lisina exhibió un tipo de inhibición competitiva con un K_i de 4.4 mM y la L-homoarginina no fué un sustrato para la arginasa de hígado.

Arginasa en fibroblastos.

Van Elsen y Leroy (4) compararon algunas propiedades cinéticas y cromatográficas de la arginasa de fibroblastos cultivados con las enzimas de hígado, riñón y eritrocitos humanos. La actividad específica de arginasa en los diferentes tejidos se muestra en la Tabla 58.

Las cinéticas de reacción de las enzimas fueron lineares durante más de 2 H. El pH óptimo en todos los tejidos y los valores de K_m aparente ($K_{m,ap}$) se presentan en la Tabla 59.

Tabla 58. Actividad de arginasa (mol urea/h/mg de proteína) en diferentes tejidos humanos. (4)

Tejido	N	Promedio	D.E.	E.E.M.	Rango
Fibroblastos	5	62	44	20	20 - 141
Hígado	6	58120	33850	11950	31000 - 117000
Riñón	7	3620	860	320	2567 - 5350
Eritrocitos	4	3470	1030	510	2100 - 4420

Todos los homogeneizados fueron activados a 55°C durante 20 min en amortiguador de glicina 20 μ M/NaOH, pH 9.7 y una mezcla de MnCl_2 y ácido maleico 0.75 μ mol, pH 7.0. La reacción se llevó a cabo a 37°C (pH 9.7) con L-arginina 12 μ mol para los fibroblastos y 20 μ mol para los otros tejidos.
 N = número de muestras; D.E. = desviación estándar; E.E.M. = error estándar de la media.

La incubación de los homogeneizados a 55°C con Mn^{+2} (0.3 .mol) activo y estabilizó a las arginasas de los diferentes tejidos. Las enzimas de hígado y eritrocitos mostraron una estabilidad mayor a 70°C por 45 min en presencia de Mn^{+2} .

Tabla 59. Constantes de Michaelis y pH's óptimos para las arginasas de tejidos humanos. (4)

Tejido	pH óptimo	K_m en μ mol
Fibroblastos	8.7	0.46
Hígado	10.0	1.25
Riñón	8.7	1.05
Eritrocitos	8.7	0.91

Los homogeneizados de fibroblastos, hígado, riñón y eritrocitos fueron analizados por cromatografía en DEAE-celulosa. La fracción A1 eluyó en amortiguador de Tris-HCl 5 mM (pH 8.3) y estuvo presente en el hígado, riñón, eritrocitos, y nueve cepas de fibroblastos examinadas (las cepas fueron establecidas a partir de biopsias de piel humana). La fracción A3 fué eluida con KCl 0.08 M y se encontró en el hígado y en algunas cepas de fibroblastos (por ejemplo la cepa 160). La enzima A4 eluida con KCl 0.18 M, fué específica para el riñón. Esta isoenzima también estuvo presente en otras cepas celulares como la 168. Además, otras cepas de fibroblastos presentaron los tres tipos de arginasa (A1, A2 y A4).

Los resultados de este estudio demostraron que los fibroblastos diploides contienen actividad de arginasa y que esta no fué derivada a partir del suero presente en el medio de cultivo (66). Las enzimas que catalizan la parte de citrulina a arginina del ciclo de la urea han sido demostradas también en células de fibroblastos cultivadas por varios investigadores (71,205).

En 1973, Rogers et al (107) encontraron deficiencia de actividad de arginasa en los fibroblastos de un paciente con argininemia. Sin embargo, en 1977, Van Elsen y Leroy (161) demostraron que los fibroblastos de tres pacientes con arginine-
nemia poseen actividad de arginasa. Las características cinéticas, pH óptimo, efecto del Mn^{+2} , valores de K_m aparente e iso-enzimas fueron idénticas a las de los controles en cada tipo ce-

lular. Estos resultados sugirieron que el gen funcional de la arginasa en fibroblastos no está relacionado a la causa de hiperargininemia en humanos.

En 1981, Konarska et al (1) comprobaron que la actividad de arginasa es intrínseca a los fibroblastos diploides y que esta no se encuentra como resultado de la contaminación exogena durante el cultivo celular.

Los experimentos fueron realizados con fibroblastos de piel normal (cepas HR y JH), y con fibroblastos de un paciente con hiperargininemia (cepa GM). El modo de cultivo celular (tratamiento con tripsina o fragmentación) demostró actividad de arginasa similar. No se encontraron diferencias significativas de actividad de arginasa entre los fibroblastos que crecieron en suero fetal de ternera o en suero humano (Tabla 60).

En otra serie de experimentos, las distintas cepas de fibroblastos fueron cultivadas en un medio libre de suero. La actividad específica de arginasa (nmol urea formada/h/mg de proteína) en las células cultivadas en el medio libre de suero fué mayor que en las células control crecidas en un medio conteniendo 10 % de suero fetal de ternera.

La cromatografía en DEAE-celulosa de las células cultivadas sin suero, separó la actividad de arginasa en dos fracciones. La fracción más pequeña A1, eluyó con el amortiguador de Tris-HCl 5 mM (pH 8.3). La segunda fracción, representando la mayor parte de la actividad, fué eluida a altas concentraciones de KCl en el amortiguador similar al de la isoenzima A4 encontrada en

todas las cepas de fibroblastos por Van Elsen y Leroy (161).

Tabla 60. Actividad de arginasa en fibroblastos de piel humana cultivados en medio conteniendo suero fetal de ternera o suero humano. (1)

Cepa celular	(n)	Actividad de arginasa en las células cultivadas con:	
		Suero fetal de ternera	Suero humano
HR	6	143.6	112.4
JH	6	104.3	102.2
GM (hiperargininemia)	4	103.5	96.0

Los fibroblastos de piel normal (cepas HR y JH) y los de un paciente con argininemia (cepa GM) fueron cultivados simultáneamente en medio nutriente suplementado con 10 % de suero fetal de ternera o con 5 % de suero humano. Los resultados representan los valores promedio a partir del número indicado (n) de cultivos crecidos independientemente. La actividad está expresada como nmol de ornitina/h/mg de proteína.

La actividad de arginasa varió con la edad de los fibroblastos. La senectud de las células estuvo acompañada no solo por un decremento en la actividad de arginasa sino también por cambios en el perfil enzimático. En los fibroblastos jóvenes, se demostraron dos formas de arginasa por cromatografía en DEAE-celulosa; la forma A1, y la forma predominante A4. En las células envejecidas, la actividad de la arginasa A1 fué la fracción

principal. Estas observaciones fueron también válidas para los fibroblastos del paciente con argininemia. Los resultados, confirmados por cromatografía en CM-celulosa, sugieren que los cambios en la actividad de la arginasa A4 son responsables de la disminución de la actividad total en células viejas.

Arginasa en placenta.

La presencia de arginasa en la placenta humana fué inicialmente demostrada por Porta et al (120). Estos investigadores purificaron la enzima de placenta aproximadamente 1,800 veces. Los pasos utilizados en la purificación se muestran resumidos en la Tabla 61.

Tabla 81. Purificación de la arginasa de placenta humana. (120)

Paso	Proteína total (mg)	Act. total unidades	Act. específica unidades/mg	Rendimiento (%)
1. Sobrenadante:	43200	2128	0.05	100
2. Acetona:	1995	583	0.3	27.9
3. Tratamiento con calor:	1050	907	0.86	42.7
4. Precipitación con etanol:	63.7	1404	22.04	66
5. Cromatografía en CM-celulosa:	5.5	271	49.2	12.75
6. Filtración en Sefadex G-150:	2.3	223	90	10.6

El proceso de purificación se llevó a cabo a 4°C. Se utilizaron placentas de gestaciones normales (infantes saludables; término de 38 a 42 semanas). Una unidad de arginasa es definida como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de urea en 60 min a 37°C.

Propiedades de la arginasa de placenta humana:

1. Cromatografía en CM-celulosa. La arginasa de placenta fué eluida como un pico simple con Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5, conteniendo KCl 1.0 M.
2. Cromatografía en Sefadex G-150 y electroforesis. La enzima purificada adicionalmente por filtración en una columna de Sefadex G-150 (equilibrada con Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5), solo mostró un pico de actividad. La electroforesis en gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sodio (pH 8.3),

confirmó la homogeneidad de la enzima.

3. **Peso molecular.** El peso molecular determinado por filtración en gel y por electroforesis a partir de una muestra pura (sexto paso, Tabla 61), fué de 70,000.
4. **Activación por iones Mn^{+2} .** La arginasa de placenta humana, al igual que otras enzimas de mamífero, depende de los iones Mn^{+2} unidos para la activación completa. La preincubación de la enzima pura a $58^{\circ}C$ por 15 min en presencia de $MnCl_2$ incremento la actividad enzimática aproximadamente 3 veces.
5. **pH óptimo.** La actividad enzimática fué ensayada en soluciones de amortiguador de Tris-HCl 0.1 M con valores de pH entre 7 y 10. El pH óptimo de la arginasa de placenta fué 9.1.
6. **Especificidad de sustrato e inhibición.** A partir de la gráfica de doble recíproco de Lineweaver-Burk, la constante de Michaelis para la arginina fué 27 mM en Tris-HCl, pH 9.1. La arginasa placentaria fué inhibida competitivamente por L-lisina ($K_i = 14$ mM) y por L-ornitina ($K_i = 6.3$ mM).

Con respecto a la función de la arginasa en la placenta humana, se sugirió la posibilidad de que la enzima aporte una reserva de ornitina para la producción de espermidina (120).

Arginasa en el Suero.

Baranczyk-Kuzma et al (5) purificaron y determinaron las propiedades de la arginasa de suero humano. El método de purificación utilizado para la arginasa de suero humano se muestra resumido en la Tabla 62.

Tabla 62. Purificación de la arginasa a partir de suero humano. (5)

Paso	Proteína total	Act. total	Act. específica	Rendimiento
	(mg)	Unidades	Unidades/mg	(%)
1. Suero:	6750	0.54	8.0×10	100
2. $(NH_4)_2SO_4$:	3769	0.49	1.3×10	90.7
3. Calentamiento a $60^\circ C$, 20 min:	1044	0.47	4.5×10	87
4. Precipitación con etanol:	180	0.44	2.3×10	81.5
5. Calentamiento a $60^\circ C$, 20 min:	65	0.30	4.3×10	55.6
6. $(NH_4)_2SO_4$:			2.0×10	46.3
7. Cromatografía en CM-celulosa:	2.9	0.23	8.0×10	42.6
8. Cromatografía en Sephadex G-150:	1.1	0.21	1.9×10	39.0

El suero fué obtenido por centrifugación de diferentes muestras de sangre. Las muestras con hemólisis se excluyeron. Los sueros de los grupos O, A, B y AB, fueron examinados. Independientemente del grupo sanguíneo, 70 I de los sueros mostraron actividad de arginasa. En 30 I de los sueros la enzima no fué observada. Una unidad de actividad enzimática fué definida como $1 \mu mol$ de producto formado (urea u ornitina) /min a $37^\circ C$.

Propiedades de la arginasa de suero humano:

1. Cromatografía en CM-celulosa. La columna empacada con CM-celulosa fué estabilizada con amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5. La enzima fué eluída como un pico simple con un gradiente de concentración de KCl 0.0-0.3 M. La arginasa de suero fué adsorbida sobre CM-celulosa pero no fué retenida por DEAE-celulosa.
2. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Se utilizó la enzima obtenida después del séptimo paso de purificación (Tabla 62). A pH 5.5, la enzima migró hacia el cátodo como tres bandas de proteína. La actividad total de arginasa fué encontrada en la fracción de movimiento más rapido. Durante la electroforesis a pH 8.9, la enzima exhibió una movilidad electroforética muy baja y fué detectada cerca del inicio.
3. Peso molecular. El peso molecular de la arginasa de suero humano determinado por filtración en gel (Sefadex G-100 y G-150) fué $120,000 \pm 5000$.
4. pH óptimo. El efecto del pH en la actividad enzimática fué estudiado en amortiguador de Tris-HCl 100 mM y glicina-NaOH 250 mM, desde pH 6 a 11. El pH óptimo para la arginasa de suero humano fué 9.2-9.6.
5. Especificidad de sustrato. La arginasa de suero humano fué altamente específica para L-arginina; esta no hidrolizó

D-arginina, L-homoarginina, y los derivados de guanidina probados: γ -guanidinopropionato, γ -guanidinobutirato, y γ -amino- γ -guanidinobutirato.

6. Efecto de la concentración de sustrato. La influencia de las concentraciones de arginina, variando desde 0.2 a 8.0 mM, sobre la actividad enzimática fué estudiada en amortiguador de glicicina-NaOH 250 mM, pH 9.4. A partir de la gráfica de Lineweaver-Burk el valor de K_m calculado fué 3.3 mM.
7. Efecto del EDTA. Después del sexto paso de purificación (Tabla 62), la arginasa de suero fué incubada con EDTA (100 mol de EDTA por 1 mg de proteína por 1 ml), a 37°C, durante 30 min a pH 7.5. Bajo estas condiciones la enzima fué completamente inactivada. El peso molecular de la arginasa inactivada fué 30,000, indicando que la remoción de los iones Mn^{+2} por EDTA conduce a la disociación en subunidades.

La arginasa de suero humano se asemeja a otras arginasas de tejidos de mamífero en muchas propiedades como peso molecular, K_m , pH óptimo, y estabilidad al calor.

La Tabla 63 muestra un resumen comparativo de las principales propiedades de las arginasas en diferentes células o tejidos humanos.

Tabla 63. Comparación de las principales propiedades de la arginasa en células o tejidos humanos.

Tejido o célula	Peso molecular	pH óptimo	Km para L-arginina	Coficiente de sedimentación
	Daltones		(mM)	(S)
Hígado	118,000 (43); 107,000 (15)	9.5 (149); 10.0 (96)	4 (43,90); 10.5 (15)	5.9 S (15)
Eritrocitos	---	9.7 (4)	0.9 (4)	---
Fibroblastos	---	9.7 (4)	0.48 (4)	---
Riñón	---	9.7 (4)	1.05 (4)	---
Placenta	70,000 (120)	9.1 (120)	27.0 (120)	---

Los números en los paréntesis indican las referencias bibliográficas. Los métodos y condiciones utilizadas en la determinación de las diferentes propiedades varían de un investigador a otro. ---, no determinado.

Estudios inmunológicos de la arginasa

Se ha observado que los macrófagos inhiben la producción de anticuerpo primario "in vitro", las respuestas inducidas por los linfocitos T, y las reacciones mezcladas de los linfocitos. El mecanismo de esta inmunosupresión no es claro aunque se ha reportado que existen factores supresivos solubles que son producidos por los macrófagos y linfocitos (26).

Eccles y Alexander (167) notaron una correlación entre el número de macrófagos y el grado de inmunosupresión acompañante (la supresión fué alta en tumores con alto contenido de macrófagos). Se ha demostrado que la supresión de la respuesta inmune es debida, al menos en parte, a la inducción de la actividad de arginasa en macrófagos cultivados "in vitro" en un medio conteniendo suero fetal de ternera (26). La arginasa agota a la arginina del medio de cultivo, previniendo el desarrollo de respuestas inmunes. Se ha demostrado también que la arginasa es el agente tumoricida en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos (77). De esta manera, la inducción de arginasa puede ser un paso funcional en la diferenciación de macrófagos que conducen a activación de la capacidad tumoricida y bactericida (194).

Jakway et al (18) reportaron que existen dos factores en el suero que son requeridos para la inducción de arginasa. Un factor estimuló la producción de prostaglandina E (PGE) por los macrófagos, fué inhibido por indometacina, y pudo ser reemplazado por la adición de PGE o (bu) CAMP. Treinta por ciento

del suero fué requerido para la actividad máxima de este factor. El otro factor requirió solo 3 % de suero, no fué inhibido por indometacina, y pudo ser detectado por su aumento en respuesta al (bu) cAMP. Estos resultados demuestran que la inducción de arginasa puede ser correlacionada con la estimulación de macrófagos.

Farram y Nelson (29) examinaron el mecanismo de acción "in vivo" de los macrófagos citotóxicos. La citotoxicidad producida por los macrófagos fué inhibida por arginina, por los inhibidores de la arginasa, ácido úrico y adenosina, y por el cAMP e hidrocortisona, pero no por ciclohexamida, puromicina o actinomicina D; esta fué resaltada por indometacina. Los macrófagos que fueron citotóxicos "in vitro" también fueron capaces de suprimir el crecimiento tumoral "in vivo".

Los macrófagos y células tumorales producen prostaglandinas las cuales aumentan los niveles de cAMP. La disminución de la producción de prostaglandinas por indometacina puede provocar una disminución en los niveles de cAMP, y un aumento correspondiente de la citotoxicidad, "in vitro" e "in vivo".

La producción de arginasa se ha propuesto como un mecanismo de citotoxicidad por macrófagos estimulados (26,77). El exceso de arginina, ácido úrico y adenosina inhibieron la citotoxicidad y la actividad de arginasa. Es posible, por lo tanto, que la citotoxicidad involucre la liberación de arginasa, preformada y no necesariamente sintetizada de nuevo, por un proceso de secreción activa. Esto no quiere decir que la producción de arginasa sea

un mecanismo universal de la citotoxicidad. Sin embargo, resulta interesante el que los macrófagos efectores que fueron aparentemente activos "in vitro" por la producción de arginasa, puedan también suprimir el crecimiento tumoral "in vivo".

Estos resultados concuerdan con la evidencia de que los macrófagos son efectores activos anti-tumor "in vivo" (129).

Schneider y Dy (144) demostraron que en respuesta a la con-canavalina A (Con A), las células de bazo de ratón producen cantidades aumentadas de urea. Este aumento resulta a partir de la actividad de arginasa degradando arginina en urea y ornitina. Es mediado por un factor protéico soluble, caracterizado por su estabilidad al calor (10 min a 80°C) y un peso molecular de aproximadamente 32,000. El factor es producido por las células T y actúa en una población celular presente principalmente en la médula ósea y bazo. Los esplenocitos colectados a partir de los recipientes de injerto de piel durante el rechazo producen más urea en respuesta a la Con A que los obtenidos a partir de ratones normales o singénicamente injertados. El incremento máximo de urea es observado justo antes del rechazo y se mantiene durante este, declinando rápidamente después. Este fenómeno es explicado: (a) por un incremento de 10-15 veces en la producción del factor resaltando la actividad de arginasa en el recipiente de injerto de células de bazo estimuladas por Con A, y (b) por una mayor sensibilidad de estos esplenocitos a la linfocina. Los autores sugirieron que el aumento en la actividad de arginasa puede reflejar la diferenciación de macrófagos en los culti-

vos de esplenocitos estimulados por Con A.

Reyero y Dorner (33) reportaron que los leucocitos humanos (granulocitos y linfocitos) poseen actividad de arginasa. Valores de actividad de arginasa menores a los normales se han encontrado (114) en varias enfermedades afectando a las células blancas de la sangre, como la leucemia linfocítica crónica, leucemia aguda y la fase terminal blástica de leucemia granulocítica.

La función fisiológica de la arginasa de leucocitos normales y células patológicas es todavía incierta. La participación del ciclo de la urea puede ser excluida debido a que las enzimas carbamil fosfato sintetasa, ornitina carbamil transferasa y el sistema arginina sintetasa no se encuentran en estas células (33).

Arginasa y enfermedades.

Arginasa en el diagnóstico clínico

Las células, por su deterioro normal, dejan escapar a la sangre diversas moléculas y, entre ellas, las enzimas. Los individuos "normales" que no presentan cuadro patológico, muestran una pequeña liberación de moléculas y consecuentemente, su actividad enzimática en suero se considera normal. Cuando una célula es dañada, las enzimas escapan a la sangre en proporción directa a la gravedad o dimensión del daño. Su cuantificación en correlación con el cuadro clínico contribuye de manera muy importan-

te al diagnóstico correcto, identificando incluso el órgano lesionado; esto justifica que la actividad de las enzimas séricas se haya correlacionado con entidades nosológicas específicas y que la determinación enzimática tenga excepcional importancia para el diagnóstico, pronóstico y guía terapéutica; estas ventajas se amplían con la determinación de las isoenzimas.

Se conocen más de sesenta enzimas circulantes, que representan el 0.1 % del total de las proteínas séricas (209). Su determinación está basada en la medición, tanto de su concentración como de su actividad, que se expresa en unidades. La determinación de las enzimas en grupo conduce a una mayor información de apoyo clínico.

De acuerdo con las recomendaciones de la Asociación Internacional de Bioquímica, las determinaciones enzimáticas deben efectuarse en condiciones óptimas de pH, concentración de sustrato y temperatura; sin embargo en algunos casos esto no es técnicamente posible, por lo que en la práctica se emplean técnicas muy aproximadas a las condiciones óptimas, que tienen alta sensibilidad y precisión.

Para evitar error en la determinación enzimática, se deben utilizar muestras de suero recientes y sin hemólisis.

La cuantificación de la actividad de arginasa en suero se ha propuesto como un apoyo para el diagnóstico y pronóstico de varias enfermedades (173), fundamentalmente las relacionadas con procesos que afectan al hígado (130,160,187,155,158, 159), corazón (188), pulmón (157) y cerebro (112,156).

La actividad de arginasa en el suero sanguíneo de personas saludables (tanto hombres y mujeres; edad: 18-40 años), oscila entre 0 y 5 unidades (188).

Con el objeto de establecer sensibilidad para la determinación de la actividad de arginasa como un índice en la detección de enfermedades, se han llevado a cabo determinaciones simultáneas de diferentes enzimas que se sabe son indicadoras del padecimiento en el órgano específico. Por ejemplo, las enzimas que se han relacionado junto con la arginasa para la indicación de enfermedades hepáticas son la transaminasa glutámica oxaloacética (GOT), transaminasa glutámica piruvica (GPT), y aldolasa (155).

Se ha observado que la actividad de arginasa sérica es elevada en personas con necrosis hepatocelular (130), junto con una actividad elevada de γ -glutamyltranspeptidasa (160) o de transaminasa glutámica oxaloacética (130). El aumento de la actividad de arginasa en mayor o menor grado se observa siempre que hay necrosis hepatocelular (187).

La actividad de arginasa en el suero de personas con hepatitis, aumenta precozmente en el período crítico; esta se normaliza en las hepatitis que tienen tendencia a la curación, y los valores altos de actividad se mantienen en las hepatitis crónicas (187).

Rodríguez et al (155) señalaron que en 95 casos de cirrosis hepática, se observó una constancia en el aumento de la actividad de arginasa sérica. Al mismo tiempo se indicó un aumento

máximo de la actividad de arginasa en los casos de cirrosis con síndrome hemorrágico reciente, explicando dicha alza por la contribución del factor hemolítico al factor hepático.

Estos mismos autores indicaron que en enfermos portadores de ictericia obstructiva, la actividad de arginasa no se altera en los 40-50 días de la evolución. Los niveles de actividad enzimática se elevan en forma moderada y constante después de una prolongación mayor de la ictericia (mas de 50 días), debido a la intervención de una necrosis parenquimatosa. En las ictericias hemolíticas, la elevación de la actividad de arginasa en suero es de origen eritrocitario y no hepático (159).

Existe un ascenso de la actividad de arginasa sérica y un descenso del seromucoide en enfermos portadores de cirrosis y en enfermos con hígado cardíaco (154). Los valores de actividad de arginasa se normalizan cuando ocurre el coma hepático, y las cifras de seromucoide ascienden cuando concominadamente hay síndrome hemorrágico o un proceso inflamatorio. De esta manera, se señala el interés que puede significar la determinación de ambos parámetros en las enfermedades hepáticas y el gran valor que representa el cociente arginasa/seromucoide.

En otro estudio, Rodríguez et al (157) señalaron que la actividad de arginasa es elevada en las cardiopatías. En los casos de insuficiencia cardíaca, el nivel de enzima se normaliza o desciende por el agotamiento de las reservas del hígado.

Por otra parte, Porembaska y Kedra (188) reportaron que la actividad de arginasa aumenta en el suero de pacientes con

infarto al miocardio. En otras enfermedades del corazón como angina de pecho, insuficiencia coronaria, o falla cardiaca, no se observó aumento de la actividad.

Se ha comprobado que la actividad de arginasa sérica es también elevada en enfermos con accidente vascular encefálico de origen hemorrágico. Se cree que este aumento se debe a la hemólisis que provoca la salida de arginasa de los eritrocitos (156).

Szilagyi et al (112) reportaron que no existe correlación entre la actividad de arginasa en suero y la actividad de arginasa en el líquido cefaloraquídeo. Los pacientes que sufren epilepsia y atrofia cerebral mostraron una elevada actividad de arginasa en el líquido cefaloraquídeo. Se observó una correlación importante entre la actividad de arginasa del líquido cefaloraquídeo y la actividad de GOT, pero no entre la actividad de arginasa y la actividad de GPT.

Las pruebas para el diagnóstico de enfermedades a través de la determinación de la actividad de arginasa en suero demuestran que aun no se ha alcanzado el objetivo de especificidad deseado. Los métodos utilizados en la determinación de la actividad de arginasa varían notablemente de un investigador a otro. Además, se ha observado que no todos los sueros analizados a partir de personas sanas contienen actividad de arginasa (5,188).

Deficiencia de arginasa

Generalmente se ha considerado a la hiperargininemia como la deficiencia de arginasa en los eritrocitos humanos (113, 161, 170), y a la argininemia como la deficiencia de arginasa hepática (169). A través de los casos reportados en diferentes pacientes (104,107,171,204), se ha demostrado que la deficiencia de arginasa es generalizada tanto en los eritrocitos como en el hígado.

La deficiencia de arginasa es heredada de una manera recesiva autosómica y es el menor defecto frecuentemente diagnosticado del ciclo de la urea. La primera descripción de este síndrome fué reportada en 1969 (104). Desde entonces, se han descrito aproximadamente 15 casos (46,54,104,107,168,169,171, 204). Con la excepción de unos hermanos jóvenes, tratados desde el nacimiento (168), el cuadro clínico es similar en todos los pacientes. Algunos de los síntomas son: pérdida de la destreza mental y motora, espasticidad, deficiencia en el crecimiento y episodios agudos de hiperamonemia. Se cree que la patogénesis de este desorden esta más relacionada a la hiperargininemia que a la hiperamonemia, ya que los niveles de amoniaco en plasma se han reportado como normales o ligeramente elevados, en algunos pacientes (171,204).

La Tabla 64 muestra una comparación del cuadro clínico de la deficiencia de arginasa en 5 pacientes diferentes.

Terapia de la deficiencia de arginasa

Spector et al (164) sugirieron que los eritrocitos de feto pueden ser células útiles para usarse en el diagnóstico prenatal de la deficiencia de arginasa. Las enzimas de eritrocitos en los fetos y en personas adultas presentaron propiedades similares.

Synderman et al (168) reportaron que la administración de una dieta baja en proteínas, iniciada lo suficientemente temprano, ayuda a prevenir todas las características clínicas desfavorables del error bioquímico.

La respuesta subóptima de la terapia convencional ha aumentado el interés en el desarrollo de nuevos y más modernos métodos de tratamiento de la deficiencia de arginasa. Algunos de los métodos reportados son: la encapsulación de la proteína (55), la difusión de eritrocitos cargados con arginasa (58,148,153), la inyección directa de arginasa en la circulación sanguínea (48), y la terapia del reemplazamiento genético (107,198). Ninguno de estos métodos ha mostrado aun, ser eficiente "in vivo" para el tratamiento de los pacientes con deficiencia de arginasa.

Tabla 64. Deficiencia de arginasa en cinco pacientes diferentes. (204)

Caso No. Sexo	1 F	2 F	3 F	4 M	5 M
Edad del principio del deterioro mental	3	<1	<1	<2	3
Espasticidad	+	+	+	+	+
Aprehensión	+	+	-	+	+
Electroencefalograma anormal	+	+	-	+	+
Ataxia	-	-	-	-	+
Atrofia cerebral	+	+	NA	NA	NA
Vómito	-	+	-	+	-
Hepatomegalia	-	+	-	-	+
Arginina en suero ($\mu\text{M/l}$)	540	996	1402	625	753
NH ₃ en sangre ($\mu\text{g/dl}$)	165-317	392-671	237-590	180	40-132
Aminoácidos aumentados en el líquido cefalorraquídeo	A	A	A, Ct, H Gl, M, T	A, Ct, O	A
Deficiencia de la enzima	RBC	RBC	RBC	RBC	RBC

Abreviaturas: A, arginina; Ct, citrulina; H, histidina; Gl, glutamina; M, metionina; T, tirosina; RBC=eritrocitos; NA: no analizado.
 Concentración normal de arginina en sangre: 61-173 $\mu\text{mol/lit}$.
 Niveles normales de amoníaco en sangre: 25-75 $\mu\text{g/dl}$.

Diferentes estudios (46,54,56) realizados para la terapia de la deficiencia de arginasa, han definido dos genes estructurales que producen dos formas distintas de arginasa. Una forma de arginasa se encuentra en los eritrocitos y en las células del

hígado, y la otra se encuentra en el riñón. Los niveles de enzima producidos por el segundo gen o "gen del riñón" son elevados en los pacientes con deficiencia de arginasa.

Se cree que la función natural de la segunda forma de arginasa es la síntesis de ornitina como precursor en la biosíntesis de prolina y poliaminas (54). Su nivel aumentado en deficiencia de arginasa parece proteger a los pacientes de una hiperamoniemia persistente y severa, y ofrece la oportunidad de estudiar el control de la expresión de ambos genes, así como la manipulación del segundo gen para la terapia de los pacientes deficientes. La terapia de reemplazamiento genético es un modelo sobresaliente para entender y tratar los errores congénitos del metabolismo en general.

Distribución de la arginasa

Son pocos los estudios que comparan la distribución de la actividad de arginasa en diferentes tejidos.

En 1970, Greengard, Sahib y Knox (32) realizaron mediciones cuantitativas que permitieron comparar la actividad de arginasa en diferentes tejidos de rata (cepa NEDH). El ensayo de la actividad de la enzima estuvo basado en el método de Schimke (207). La Tabla 1 muestra la comparación de la actividad de arginasa en los diferentes tejidos de rata.

La alta actividad de arginasa del hígado de rata adulto tiende a minimizar las actividades pequeñas pero no despreciables de algunos tejidos extrahépatos. El hepatoma Dunning (no

diferenciado) contuvo solo 10 % de la actividad de arginasa del hígado normal. Sin embargo, el riñón y el intestino delgado mostraron actividades de arginasa significativas.

Entre los tejidos fetales analizados, solo se observó un aumento de la actividad de la arginasa hepática inmediatamente despues del nacimiento. El aumento fué ligeramente mayor en ratas macho comparadas con ratas hembra. posteriormente, la actividad se desarrolla a una concentración más alta en el hígado adulto, y a concentraciones pequeñas pero significativas en el intestino delgado, riñón y pancreas.

Las actividades más altas encontradas en los tejidos extra-hepáticos corespondieron al intestino delgado, riñón, páncreas y glándula mamaria lactante.

Método representativo para la purificación y actividad de arginasa

Los métodos desarrollados para la purificación y determinación de la actividad de arginasa son muy variados y numerosos. Los distintos métodos dependen de las propiedades de la enzima y de la localización intracelular en un tejido determinado.

El siguiente método fué desarrollado por Schimke (207) para la purificación de la arginasa de hígado de rata. Todos los pasos del proceso se desarrollan a 4°C, excepto en donde se menciona otra temperatura:

1. Extracción. La muestra de hígado, generalmente pesando de 15 a 50 g, es homogeneizada en 3 volúmenes (del peso original de hígado) de Tris-HCl, pH 7.5, que contiene $MnCl_2$ 0.05 M y KCl 0.10 M. El homogeneizado se centrifuga por 10 min. 15,000 x g, y el sobrenadante es retenido.
 2. Precipitación con acetona. Al sobrenadante se le adicionan 1.5 volúmenes de acetona a $-10^{\circ}C$. El precipitado obtenido se centrifuga por 5 min a 15,000 x g y a $-10^{\circ}C$. El precipitado se homogeneiza en 0.7 volúmenes de Tris-HCl, pH 7.5, que contiene 0.05 M de $MnCl_2$. El homogeneizado se centrifuga por 10 min a 15,000 x g y el sedimento se descarta. El fluido del sobrenadante se dializa durante 3-4 h.
 3. Tratamiento con calor. La solución dializada se calienta a $60^{\circ}C$ por 20 min, se enfría en un baño de hielo, y se centrifuga por 10 min. a 15,000 x g. El precipitado se descarta.
 4. Precipitación con etanol. La solución del sobrenadante se enfría $0^{\circ}C$. Se adiciona etanol a $-10^{\circ}C$ (conteniendo $MnCl_2$ 0.05 -M) en un volumen igual al volumen de la solución enzimática. El precipitado obtenido por centrifugación es descartado. Se añade una cantidad adicional de etanol equivalente a 3 veces el volumen de la solución inicial de enzima y el pp. se colecta por centrifugación.
- Este pp. se suspende en 3-6 ml de Tris-HCl, conteniendo $MnCl_2$ 0.05 M y glicina volumen de la solución inicial de enzima inicial de enzima y el precipitado se colecta por centrifugación.

Este precipitado se suspende en 3-6 ml de Tris-HCl, pH 7.4, conteniendo $MnCl_2$ 0.05 M y glicina 0.05 M, e inmediatamente se congela y liofiliza.

5. Cromatografía sobre CM-celulosa. La CM-celulosa se utiliza sin tamizar. Esta se lava con $NaOH_2N$, después con $NaCl_2M$, y por último con agua. Posteriormente la celulosa se lava con Tris 1.0 M y de nuevo con agua hasta que el pH es 7. Las columnas (0.2 x 5 cm) se empacan bajo 1 libra de presión de aire y se equilibran con Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5, sin $MnCl_2$.

El precipitado liofilizado se disuelve en 5 ml de Tris-HCl, 0.01 M, pH 7.5. La solución se coloca sobre la columna y se aplica presión de aire (2 a 4 libras) para obtener velocidades de flujo de 1 ml por min. La arginasa es eluida con 5 ml de L-arginina 0.2 M en Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5.

La solución final es dializada por 12 h contra Tris-HCl 0.01 M, conteniendo $MnCl_2$ 0.01 M. El eluato es liofilizado o concentrado por ultrafiltración.

El producto final es incoloro y la actividad enzimática es estable a 4°C por períodos que superan las 6 semanas.

La Tabla 65 muestra el esquema representativo de la purificación de arginasa.

Tabla 55. Purificación de la arginasa a partir del hígado de rata. (207)

Paso	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Act. específica unidades/mg	Act. total unidades
-Homogeneizado	118	31.2	4	25,800
-Sobrenadante del homogeneizado	85	31.7	10	27,000
-Acetona	26	15.6	58	23,500
-Calentamiento	23	4.9	221	24,800
-Etanol	5	4.4	1,012	22,400
-CM-celulosa *	1.5	2.4	5,320	19,900

Se utilizaron 3 animales mantenidos en una dieta conteniendo 30 % de caseína.
 * Después de la concentración por ultracentrifugación.

Schimke (64) utilizó un método para el ensayo de la actividad de la arginasa que se basa en la determinación colorimétrica de la urea formada. En este método, la actividad de arginasa es incrementada por preincubación del homogeneizado o de las preparaciones purificadas (de hígado de rata) con $MnSO_4$ 0.05 M a 55°C durante 5 min. El medio de reacción contiene L-arginina 0.250 M, pH 9.7, y sulfato de manganeso, 0.001 M. La incubación se lleva a cabo durante 10 min en 1.0 ml, conteniendo 20 μ l de la preparación de tejido. La reacción se detiene por adición de 2.5 ml de ácido perclórico al 15 %. Se utiliza una alícuota de 100 μ l para el desarrollo del color.

La unidad de actividad de arginasa se expresa como micro-moles de urea formada por hora a 37 °C.

CONCLUSIONES.

Los estudios sobre las propiedades de la arginasa demuestran que las enzimas distribuidas en diferentes tejidos son proteínas distintas que por lo tanto deben tener una función específica (aún no completamente definida).

La función que se les ha asignado a las múltiples formas de arginasa en tejidos extrahepáticos es la síntesis de ornitina como precursor en la biosíntesis de prolina y/o poliaminas.

La enzima mejor caracterizada en cuanto a regulación y función es la arginasa hepática. Su participación dentro del ciclo de la urea y su regulación a través de hormonas, esta bien documentada.

Existen diferencias notables entre los estudios realizados en la caracterización de la arginasa de un mismo tejido, principalmente en lo que se refiere a la homogeneidad. Es evidente que las diferencias de resultados entre los investigadores son debidas a las múltiples métodos de purificación y determinación de la actividad de arginasa.

Sin duda, los estudios futuros de la expresión genética de la arginasa permitirán entender con mayor claridad, los aspectos de evolución, regulación y función de las distintas enzimas. De igual manera se podrán establecer métodos eficaces para el diagnóstico y terapia de su deficiencia.

GLOSARIO.

NADP	Nicotinamida adenin dinucleotido (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenin dinucleotido (forma reducida)
RNA	Acido ribonucleico
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
DNA	Acido desoxiribonucleico
cdNA	Acido desoxiribonucleico complementario
D.E.	Desviación estandar
E.M.M.	Error estandar de la media
EDTA	Acido etilen diamino tetra acético
DEAE-celulosa	Dietil amino etil-celulosa
CM-celulosa	Carboximetilcelulosa
(bu) ₂ AMPC	dibutiril monofosfato cíclico de adenosina
mM	milimolar
μM	micromolar
nmol	nanomol
Kg	Kilogramo
g	gramo
mg	miligramo
dl	decilitro
l	litro
ml	mililitro
h	hora
min	minutos
seg	segundos
mμ	milimicra

BIBLIOGRAFIA.

- (1) Konarska, L., Wiesmann, U. and Colombo, J.P.: Arginase activity in human fibroblast cultures. Clin. Chim. Acta., 115: 85-92, 1981.
- (2) Farron, F.: Arginase isoenzymes and their detection by catalytic staining in starch gel. Anal. Biochem., 53: 264-268, 1973.
- (3) Jergovic, I., Zuzic, I., Fiser-Herman, M. and Straus, B.: A simple method for serum arginase determination Clin. Chim. Acta., 30: 765-774, 1970.
- (4) Van Elsen, A. and Leroy, G.: Arginase isoenzymes in human diploid fibroblasts. J. Biol. Chem. 62 (2): 191-198, 1975.
- (5) Baranczyk-Kuzma, A., Skrzypek-Osiecka, I., and Porembaska, Z.: Arginase from human blood serum. Biochem. Med., 26: 174-184, 1981.
- (6) Ville-Breitburd, F. and Orth, G.: Rabbit liver arginase. J. Biol. Chem., 247: 1227-1235, 1972.
- (7) Hosoyama, Y.: The reversible inactivation of rat liver arginase at low pH. Eur. J. Biochem., 27: 48-52, 1972.
- (8) Negoya, M.: Ultramicromethod for the determination of human arginase in the presence of urea. Clin. Chim. Acta., 71: 413-418, 1976.
- (9) Verma, A. and Boutwell, B.: Characterization of arginase activity from mouse epidermis and its relation to ornithine decarboxylase induction by the tumor-promoting

- agent, 12-O- tetradecanoylphorbol -13-acetate. *Biochim. Biophys. Acta.*, 677: 184-189, 1981.
- (10) Herzfeld, A. and Raper, S.: **The heterogeneity of arginase in rat tissues.** *Biochem J.*, 153: 469-478, 1976.
- (11) Yip, M., Morris, C. and Knox, W.: **Function of arginase in lactating mammary gland.** *Biochem. J.*, 127: 893-899, 1972.
- (12) Harri, M. and Hartiala, K.: **Arginase activity in rat small intestinal mucosa.** *Acta. Physiol. Scand.*, 89: 126-128, 1973.
- (13) Oka, T. and Perry, J.: **Arginase effects lactogenesis through its influence on the biosynthesis of spermidine.** *Nature.*, 250:660-661, 1974.
- (14) Pace, C. and Landers, R.: **Arginase inhibition.** *Biochem. Biophys. Acta.*, 658 (2): 410-412, 1981.
- (15) Beruter, J., Colombo, J. and Bachmann, C.: **Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes.** *Biochem. J.*, 175: 449-454, 1978.
- (16) Aguirre, R. and Kasche, V.: **Catalytically active monomer forms of immobilized arginase.** *Eur. J. Biochem.* 5767: 307-314, 1982.
- (17) Remesar, X., Arola, Ll., Palou, A., and Alemany, M.: **Arginase activity during pregnancy and lactation.** *Horm. Metab. Res.*, 16: 468-470, 1984.
- (18) Ruegg, U. and Russell, A.: **A rapid and sensitive assay for arginase.** *Anal. Biochem.*, 102: 206-212, 1980.

- (19) Carvajal, N., Martinez, J. and Fernandez, M.: Immobilized monomers of human liver arginase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 481: 177-183, 1977.
- (20) Freeman, James, J. and Williams, M.: Estrogenic induction of uterine arginase activity. *Horm. Metab. Res.*, 3: 352, 1971.
- (21) Cheung, C. and Raijman, L.: Arginine, mitochondrial arginase and the control of carbamyl phosphate synthesis. *Archives of Biochem. and Biophys.*, 209: 643-649, 1981.
- (22) Matsuzaki, S., Suzuki, M. and Hamana, K.: A possible role of arginase in the regulation of polyamine biosynthesis in the rat thyroid. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 98 (1): 57-61, 1981.
- (23) Holtta, e. and Pohjanpelto, P.: Polyamine dependence of chinese Hamster ovary cells in serum-free culture is due to deficient arginase activity. *Biochem. Biophys. Acta.*, 721: 321-327, 1982.
- (24) Jakway, J. and Morris, H.: Serum factors required for arginase induction in macrophages. *Cellular Immunol.*, 54: 253-263, 1980.
- (25) Glass, R. and Knox, E.: Arginase isozymes of rat mammary gland, liver, and other tissues. *J. Biol Chem.*, 248: 5785-5789, 1973.
- (26) Kung, J., Brooks, S. and Jakway, J.: Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. *J. Exp. Med.*, 149: 665-672, 1977.

- (27) Geyer, J. and Dabich, D.: Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. Anal. Biochem., 39: 412-417, 1971.
- (28) Davis, R. and Paulus, T.: Uses of arginaseless cells in the study of polyamine metabolism (*Neurospora crassa*). Methods Enzimol., 94: 112-116, 1983.
- (29) Farram, E. and Nelson, D.: Mechanism of action of mouse macrophages as antitumor effector cells: role of arginase. Cell Immunol., 55 (2): 283-293, 1980.
- (30) Stewart, J. and Caron, H.: Arginases of mouse brain and liver. J. Neurochem., 29: 657-663, 1977.
- (31) Fujimoto, M., Kameji, T. and Kanaya, A.: Purification and properties of rat small intestinal arginase. J. Biochem., 79: 441-449, 1976.
- (32) Lin, R., Snodgrass, P. and Rabier, R.: Induction of urea cycle enzymes by glucagon and dexamethasone in monolayers cultures of adult hepatocytes. J. Biol. Chem., 257 (9): 5061-5067, 1982.
- (33) Reyerer, C. and Dorner, F.: Purification of arginases from human-leukemic lymphocytes and granulocytes of their physicochemical and kinetic properties. Eur. J. Biochem., 56: 137-147, 1975.
- (34) Sadasivudu, B., and Indira, H. R.: Distribution of the rat enzymes involved in the disposal of arginine and ornithine in different regions of rat brain. Brain research., 79: 326-329, 1974.

- (35) Reddy, P.U.M. and Ramana Rao, J.V.: Inhibition of arginase in sheep brain homogenates by some L-amino-acids. *Experientia.*, 37: 814, 1980.
- (36) Rahmatullah, M., Fong, Y.Y. L., Lee, J.S.K. and Boyde T.R. C.: Zinc- deficiency and rat activities of urea cycle related enzymes in rats. *Experimentia.*, 36: 1281-1282, 1980.
- (37) Kuchel, P. W., Nichol, L. W. and Jeffrey, P. D.: Interpretation of the kinetics of consecutive enzyme catalyzed reactions. *Studies on the arginase-urease system. J. Biol. Chem.*, 20: 8222-8227, 1975.
- (38) Tarrab, R., Rodriguez, J., Huitron, C., Palacios, R. and Soberón, G.: Molecular forms of rat liver arginase. Isolation and characterization. *Eur. J. Biochem* 457-458, 1974.
- (39) Rosenfeld, J.L., Dutta, S.P., Cheda, G.B. and Tritsch, G.L.: Purine and inhibitors of arginase. *Bioch., Biophys. Acta.*, 410:164-166, 1975.
- (40) Terayama, H., Koji, T., Kontani and Myokumoto, T.: Arginase as an inhibitory principle in liver plasma membranes arresting the growth of various mammalian cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.*, 720:188-192, 1982.
- (41) Carvajal, N., Acona, M., and Rodriguez, J.P.: Evidence for cooperative effects in human liver arginase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 701:146-148, 1982.

- (42) Skog, S., Eriksson, V. and Eliasson E.: Arginase and-phase enzyme in a human cell line. Biochim. Biophys. Acta., 672: 33-44, 1981.
- (43) Carvajal, N., Venegas, A., Oestreicher, G. and Plaza, M.: Effect of manganese on the quaternary structure of human liver arginase. Biochim. Biophys. Acta., 250:437-442, 1971.
- (44) Pohjanpelto, P. and Holtta, E.: Arginase activity of different cells in tissue culture. Biochim. Biophys. Acta., 757:191-195, 1983.
- (45) Méndez, J.D., Yáñez, R., Wong, C. and Hicks, R.: Uterine arginase inhibition affect the rat embryonic development. Contraception., 33:597-604, 1986.
- (46) Spector, E. B., Riece, S. C. H. and Cederbaum, S. D.: Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase defficient patients. Pediatric. Res. 17 (12): 941-944, 1983.
- (47) Haggerty, D. F., Spector, E. B.: Regulation by glucocorticoids of arginase and argininosuccinate synthetasa in cultured rat hepatoma cells. J. Biol. Chem. 257 (5): 2246-2253, 1982.
- (48) Spector, E.B., Cotta-Dethlefs, H., Kern, R.M.: The rate of injusted arginase in the rabbit. Am. J. Hum. Genet., 34: 47A, 1982.
- (49) Shih, V.E. and Jones, C.T.: Arginase defficiency in Macaca fasciculams. 1. Arginase activity and arginine concentration in erythrocytes and liver. Pediatric. Res. 6:

- (50) Terasaki, K., Spector, E.B.: Properties of arginase from liver of Macaca fasciculans. Comparison of normals with red blood cell arginase deficient monkeys. *Biochem.Genet.*, 18:829-841, 1980.
- (51) Lehninger, A. L.: *Biochemistry*. Worth, New York, 591, 1970
- (52) *Bioquímica e Inmunología*. Juan José Hicks y Juan C. Díaz Zagoya. Tomo 1, paginas 687-688, 280. 1era. edición, 1988.
- (53) Spector, E.B., Rice, S.C., Kern, R.M., Hendrikson R. and Cederbaum, S.D.: Comparison of arginase activity in red blood cells of lower mammals, primates, and man: evolution to high activity in primates. *Am. J. Hum Genet.*, 37 (6): 1138-45, 1985.
- (54) Bernar, J., Hansen, R.A., Phoenix, P., MS, Shaw, N.F. and Cederbaum, S.D.: Arginase deficiency in a 12 year old boy with impairment of intellectual function. *J. Pediatr.* 108 (3): 432-5, 1986.
- (55) Kanalas, J.J., Spector, E.B. and Cederbaum, S.D.: Hollow-Fiber Reactors containing mammalian arginase: an approach to enzyme replacement therapy. *Biochem. Med.* 27:46-55, 1982.
- (56) Cederbaum, S.D. and Moedjono, S. J.: Threatment of hyperargininemia due to arginase deficiency with a Chemically defined diet. *J. Inher. Metab. Dis.* 5: 95-99, 1982.
- (57) Naylor, E.W. and Cederbaum, S.D.: Urinary midine excretion

- in arginase deficiency. *J. Inher Metab. Dis.* 4:207-210, 1981.
- (58) Kruse, C.A., Spector, E.B., Cederbaum, S.D. and Bernardine, J.: Microinjection of arginase into enzyme-deficiency cells with the isolated glycoprotein of SENDAI VIRUS AS FUSOGEN. *Biochim. Biophys. Acta*; 327:157-65, 1973.
- (59) Bond, J. S.: Effect of manganese and aminoacids on proteolytic inactivation of beef liver arginase. *Biochim. Biophys. Acta*; 327:157-65, 1973.
- (60) Schimke, R.T.: Enzymes of arginine metabolism in Mammalian cell cultivation. 239:136-144, 1964.
- (61) Hirsch-Kolb, H., Kolb, H.J., and Greenberg, D.M.: Nuclear magnetic resonance studies of manganese binding of rat liver arginase. 246:395-401, 1971.
- (62) Redmond, A. F. and Rothberg, S.: Arginase activity and other cellular events associated with epidermal hyperplasia. *J. Cell. Physiol.* 94:99-104, 1978.
- (63) Baldwin, R. L. and Milligan, L. P.: Enzymatic changes associated with the initiation and maintenance of lactation in the rat. *J. Biol. Chem*; 241:2058-2065, 1966.
- (64) Schimke, R.T.: Adaptive characteristics of cycle enzymes in the rat. *J. Biol. Chem*; 237:459-468, 1962.
- (65) Manning, R.T. and Grisola, S.: Serum arginase activity. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*; 95:225-226, 1957.
- (66) Kihara, H. and de la Flor, S.D.: Arginase in fetal calf serum. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*; 129: 303-

304, 1968.

- (67) Volpe, P., Menna, T., and Pagano, G.: **Ornithine & Transaminase heterogeneity and regulation.** Eur. J. Biochem., 44:455-458, 1974.
- (68) Hirsch - Kolb, H. and Greenberg, D. M. : **Molecular characteristics of rat liver arginase.** J. Biol. Chem.; 243:6123-6129, 1968.
- (69) Honn, K.V., Singley, J.A. and Chavin, W.: **Fetal Bovine serum: Amultivariate Standard.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med:149:344-347, 1975.
- (70) Reddy, S.R.R. and Campbell, J.W.: **Low molecular weight arginase in the earth worm.** Biochim. Biophys. Acta, 159: 554-557, 1968.
- (71) Tedesco, T. A. and Mellman, W. J. : **Argininosuccinate synthetase activity and citrulline metabolism in cells cultured from a citrullinemic subject.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57:829-834, 1967.
- (72) Kaysen, G. A. and Strecker, H. J.: **Purification and properties of arginase of rat kidney.** Biochem. J, 133:779-788, 1973.
- (73) Reddy, S.R.R. and Campbell, J. W.: **Arginine metabolism in insects.** Biochem. J. 115:495-502, 1969.
- (74) Hunter, A. and Downs, C.E.: **The inhibition of arginase by aminoacids.** J. Biol. Chem. 157:427-446, 1945.
- (75) Gordon, D., Bray, M. A. and Morley, J.: **Control of lymphokine secretion by prostagladins.** Nature (London)

262: 401-404, 1976.

- (76) Saito, K., Morris, H.P. and Weinhouse, S.: **Phosphorylase: A new isozyme in rat hepatic tumors and fetal liver Science.** 178:879-886, 1972.
- (77) Currie, G.A.: **Activated macrophages kill tumour cells by releasing arginase.** Nature (London) 273:758-759, 1978.
- (78) Lusty, C.J.: **Catalytically active monomer and dimer forms of rat liver carbamoyl-phosphate synthetase.** Biochemistry, 20:3665-3675, 1981.
- (79) Middelhoven, W.J.: **The terrousion as the cofactor of arginase in vivo. I. Properties of yeast arginase metallo-complexes of known composition and of native arginase.** Biochim. Biophys. Acta, 191:110-121, 1969.
- (80) Carvajal, N., Martinez, J., Montes de Oca, F., Rodriguez, J. and Fernandez, M.: **Subunit interactions and immobilised dimers of human liver arginase.** Biochem. Biophys and Acta, 527:1-7, 1978.
- (81) Grazi, E. and Magn, E.: **Molecular characteristics of chicken liver arginase.** Biochem. J. 126:667-674, 1972.
- (82) Grazi, E., Magn. E., and Sangiorgi, G.: **Stimulation by cortisol and insulin of the "ureotelic" arginase activity of chicken liver.** Biochem. J. 128:735-736, 1972.
- (83) Eagle, H.: **Amino acid metabolism in mammalian cell cultures Science.** (Wash. D. C.) 130:432-437, 1952.
- (84) Briggs, S. and Freedland, R. A.: **Effect of lactate and ornithine on urea synthesis in isolated rat liver cells**

Physiologist 18: 152, 1975.

- (85) Hellerman, L. and Perkins, M.E.: Activation of enzymes. III. the role of metal ions in the activation of arginase. The hydrolysis of arginine induced by certain metal ions with urease. J. Biol. Chem, 112:175-194, 1935.
- (86) Ham, R.G.: Putrescine and related amines as growth factors for a mammalian cell line. Biochem. Biophys. Res. Commun. 14:34-38, 1964.
- (87) Strecker, H. J.: Purification and properties of rat liver ornithine α - transaminase. J. Biol. Chem.; 240: 1225-1230, 1965.
- (88) Cabello, J., Prajoux, V. and Plaza, M.: Immuno diffusion studies on human liver and erythrocyte arginases. Biochim. Biophys. Acta, 105: 583-593, 1965.
- (89) McLean, P. and Gurney, M. W.: Effect of adrenalectomy and growth hormone on enzymes concerned with urea synthesis in rat liver. Biochem. J. 87: 96-104, 1963.
- (90) Bascur, L., Cabello, J., Veliz, M. and Gonzalez, A.: Molecular forms of human liver arginase. Biochem. Biophys. Acta 128: 149-154, 1966.
- (91) Eliasson, E. E. and Strecker, H. J.: Arginase activity during the growth cycle of Chang's liver cells. J. Biol. Chem. 241:5757-5763, 1966.
- (92) Schimke, R. T.: Studies on factors affecting the levels of urea cycle enzymes in rat liver. J. Biol. Chem. 238: 1012-1018, 1963.

- (93) Sadasivudu, B. and Rao, I. I.: Studies on functional and metabolic role of urea cycle intermediates in brain. *J. Neurochem* 27:785-794, 1976.
- (94) Folley, S.J. and Greenbaum A. L.: Changes in the arginase and alkaline phosphatase contents of the mammary gland and liver of the rat during pregnancy, lactation and mammary involution. *Biochem. J.* 41:261-268, 1947.
- (95) Nishibe, H. and Makino, H.: Automated determination of arginase in human erythrocytes. *Anal. Biochem.* 43:357-364 1971.
- (96) Cabello, J., Basilio, C. and Prajoux, U.: Kinetic properties of erythrocyte and liver arginase. *Biochim. Biophys. Acta:* 48:148-152, 1961.
- (97) Vegotsky, A. and Frieden, E.: The significance of substrate concentration to in vivo enzyme reactions. *Enzymologia* 19:143-150, 1958.
- (98) Carulli, N., Kaihara, S. and Wagner, H. N.: Radioisotopic Assay of Arginase Activity. *Biochem.* 24:515-522, 1968.
- (99) Hunninghake, D. and Grisolia, S.: A sensitive and convenient micromethod for estimation of urea, citrulline, and carbamyl derivatives. *Anal. Biochem.* 16:200-205, 1966.
- (100) Pennincky, M., Simon J-P. and Wiame, J-M.: Interaction between arginase and L-ornithine carbamoyltransferase in *saccharomyces cerevisiae*. *Ecr. J. Biochem.* 49:429-442, 1974
- (101) Sasada, M. and Terrayama, H.: The nature of inhibition of DNA synthesis in rat-liver hepatoma cells. *Biochim.*

Biophys. Acta: 190:73-87, 1969.

- (102) Kawakami, H. and Terayama, H.: Liver plasma membranes and proteoglycan prepared therefrom inhibit the growth of hepatoma cells in vitro. Biochim. Biophys. Acta 646: 161-168, 1981.
- (103) De Duve, C.: From cytochromes to lysosomes. Fed. Proc. 23:1045-1049, 1964.
- (104) Terheggen, H. G., Schwenk, A., Lowenthal, A., Van Sande M. and Colombo, J.P.: Argininaemia with arginase deficiency. Lancet 2:748-749, 1969.
- (105) Brusilow, S.W., Tinker, J. and Batshaw, M.L.: Amino acid acylation: a mechanism of nitrogen excretion in inborn errors of urea synthesis. Science 207:659-661, 1980.
- (106) Dizikes, G. J., Grody, W. W., Kern, R. M., and Cederbaum, S. D.: Isolation of human liver arginase cDNA and demonstration of nonhomology between the two human arginase genes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 141 (1): 53-59, 1986.
- (107) Rogers, S., Lowenthal, H. G., Terheggen, H. G. and Colombos, J. P.: Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. J. Exp. Med. 137:1091-1096, 1973.
- (108) Mephram, T. B. and Linzell, J. L.: Urea formation by the lactating goat mammary gland. Nature (London) 214-507-508, 1967.
- (109) Klein, D. and Morris, D. R.: Increased arginase activity

- during lymphocyte mitogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun, 81:199-204, 1978.
- (110) Jurgensen, S.R., Wood, D.C., Mahler, J. C. and Harrison, J. H.: The immobilization of mitochondrial malate dehydrogenase on sepharose beads and the demonstration of catalytically active subunits. J. Biol. Chem. 256: 2383-2388, 1981.
- (111) Haraguchi, Y., Takiguchi, M., Amaya, Y., Kawamoto, S., Matsuda, I. and Mori, M.: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (2): 412-415, 1987.
- (112) Szilagyi, K. A.: Studies an arginase activity in the cerebrospinal fluid. J. Neurol. Sci., 18:143-54, 1973.
- (113) Naylor, E. W., Orfanos, A. P. and Guthrie, R.: Simple screening test for arginase deficiency (hyperargininemia). J. Lab. Clin. Med. 89 (4): 876-80, 1977.
- (114) Tanaka, K. R. and Valentine, W. N.: The arginase activity of human leukocytes. J. Lab. Clin. Med. 56:754-759, 1960.
- (115) Satoh, S., Yoshida, I. and Ito. Y.: Studies on the arginase activity of Shope papilloma. Possible presence of isozymes. Virology 33:354-356, 1967.
- (116) Alhonen-Hongisto, L, Seppanen, P., Holtta, and Janne, J.: Replacement of natural polyamines by cadaverine and its aminopropyl derivates in Ehrlich ascites carcinoma cells. Biochem. Biophys. Res. Common. 106:291-297, 1982.
- (117) Gebhardt, R. and Mecke, D.: Permissive effect of

dexamethasone on glucagon induction of urea-cycle enzymes in perfused primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Ecis. J. Biochem.*: 97:29-35, 1979.

- (118) Eliasson, E.: Repression of arginase synthesis in Chang liver cells. *Expt. Cell. Res.* 48:1-17, 1967.
- (119) Harell, D. and Sokolovsky, M.: Beef-liver arginase. Isolation and molecular properties. *Eur. J. Biochem.* 25:102-108, 1972.
- (120) Porta, R., Esposito, C., Martin and Della Pietra, G.: Arginase from human full-term placenta. *Biochem. J.* 159: 579-583, 1976.
- (121) Aisbitt, R. PG. and Barry, J.M.: Stimulation by insulin of ornithine decarboxylase activity in cultured mammary tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 320:610-616, 1973.
- (122) Mora, J., Martuscelli, J., Ortiz-Pineda, J. and Soberon, G.: The regulation of urea - biosynthesis enzymes in vertebrates. *Biochem. J.* 96: 28-35, 1965.
- (123) Van Slyke, D. D. and Archibald, R. M.: Gasometric and photometric measurement of arginase activity. *J. Biol. Chem.* 165:293-309, 1946.
- (124) Snodgrass, P.J., Lin, R. C., Muller, W. A. and Aoki, T.T.: Induction of urea cycle enzymes of rat liver by glucagon. *J. Biol. Chem.* 253 (8): 2748-2753, 1978.
- (125) Brown, G.W. and Cohen, P.P.: Comparative biochemistry of urea synthesis. *J. Biol. Chem.*; 234 (7): 1769-1774, 1959.
- (126) Chan, W. W. C.: Matrix-bound protein subunits. *Biochim.*

Biophys. Res. Commun. 41 (5): 1198-1204, 1970.

- (127) Homes, J. C., Bonney, R. J., Pelus, Dahlgren, M. E., and Sodowski, S. J.: **Macrophages synthesise and release prostaglandins in response to inflammation stimuli.** Nature (London) 269: 149-150, 1977.
- (128) Kawamoto, S., Amaya, Y., Murakami, K., Tokunaga, F., Iwanaga, S., Kobayashi, K, Saher, T., Kimura, S. and Mori, M.: **Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver arginase.** J. Biol. Chem. 262 (13): 6280-6282, 1972.
- (129) Wood, G. W. and Gillespie, G. Y.: **Studies on the role of macrophages in regulation of growth and metastasis of murine chemically induced fibrocarcinomas.** Int. J. Cancer 16: 1022-1029, 1975.
- (130) Ugarte, G., Pino, M. D., Pino, M. E., Peirano, P. and Marusi, F.: **Serum arginase activity in subjects with hepato cellular damage.** J.Lab. Clin. Med. 55:522-528,1960.
- (131) Rogers, S. and Moore, M.: **Studies of the mechanism of actions of the Shope rabbit papilloma virus.** J. Exp. Med. 117:521-540, 1963.
- (132) Greengard, O., Sahib, M.K. and Knox, W. E.: **Developmental formation and distribution of arginase in rat tissue.** Arch. Biochim. 137:477-482, 1970.
- (133) Cotton, D. W. K. and Mier, P. D.: **Role of arginase in the epidermis.** Nature (London) 252:616, 1974.
- (134) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and

- Randall, J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
- (135) Haider, M. and Segal, H.L.: Some characteristics of the alanine aminotransferase and arginase. Inactivating system of Lysosomes *Arch. Biochem. Biophys.* 148:228-237, 1972.
- (136) Larsson, G., Bolcsfoldi, G. and Eliasson, E.: Arginase in Chang's liver cells. *Acta Chem. Scand (B)* 28:233-238, 1974
- (137) Husson, A. and Vaillant, R.: Control activities and regulation by glucocorticoids of three urea-cycle enzymes in rat fetal liver. Argininosuccinate synthetase, arginino-succinase and arginase. *Experientia* 31 (12): 1403-1405, 1975.
- (138) Fearon, W.R., Gornall, A.G., Hunter, Archibald, R. M. and Hamilton: Plasma Citrulline and Allantion. *Biol. Chem.* 156: 121-141, 1944.
- (139) Carter, B. L., Sebastian, J. and Halvorson. H. Scerevisiae: The regulation of the synthesys of arginine catabolizing enzymes during the cell cycle in *saccnaromyces*. *Adv. Enzyme Regul.* 9:253-63, 1970.
- (140) Richardson, U. I., Snodgrass, P. J., Nuzum, C.T. and Tashijan A. H. Jr.: Establishment of a clonal strain of hepatoma cells which maintain in culture the five enzymes of the urea cycle. *J. Cell. Physiol.* 83:141-150, 1974.
- (141) Kadowaki, H., Israel, H. W. and Nesheim, M. C.: Intracellular localization of arginase in chick kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 437 (1): 158-65, 1976.

- (142) Ratner, S.: Preparation of N- L-Acetyl L-Ornithine from N-L Acetyl-L-Arginine, a new substrate for arginase. 73: 423-429, 1976.
- (143) Schimke, R.T.: Differential effect of fasting and protein-free diets on levels of urea cycle enzymes in rat liver. J. Biol. Chem. 239, 3808-17, 1964.
- (144) Schneider, E. and Dy. M.: Demonstration of a concavalin A-induced lymphokine enhancing arginase activity. Effect of presensibilization by skin allograft. Eur. J. Immunol. 13:977-983, 1983.
- (145) Mimic-Oka, Z. J, Cupie, Z. and Japundzic, I.: Effect of adrenal function on level of hepatic and extrahepatic arginase. Experientia. 27 (12):1477-8, 1971.
- (146) Sans, N., Schroder, G. and Schoder, J.: The noc region of Ti plasmid C58 codes for arginase and ornithine cyclodeaminase. Eur. J. Biochem. 167:81-87, 1987.
- (147) Silva, A.C. and Alburquerque, Z.P.: Effect of experimental chronic renal failure upon the production of urea, as measured by the liver arginase activity in rats. Experientia 34 (11): 1465-6, 1978.
- (148) Kruse, C. A. and Popjak, G.: Fractionation of arginase-loaded erythrocyte ghosts with percoll density gradients. Biochim. Biophys. Res. Commun. 102(1): 258-64, 1981.
- (149) Carvajal, N., Rodriguez, J.P., Fernandez, M., and Hybrid: Immobilized dimmers of human liver arginase. Biochim. Biophys. Acta 701:405-407, 1982.

- (150) Bond, J.S.: A comparison of the proteolytic susceptibility of several rat liver enzymes. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 43 (2): 333-9, 1971.
- (151) Kawamoto, S., Amaya, Y., Oda, T., Kuzum, T., Sahek, T., Kumura, S. and Morris, M.: Cloning and expression in Escherichia coli of cDNA for arginase of rat liver. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 136 (3): 955-961, 1986.
- (152) Cacciatore, L. and Antonietto, S.: Arginase activity of mouse serum and liver tissue in some conditions of experimental liver damage. *Enzymologia* 41:112-30, 1971.
- (153) Adrienssens, K., Karchev, D., Lowenthal, A., and Terheggen, H. G.: Use of enzyme - loaded erythrocytes in familial hyperargininemia. *Clin. Chem.* 22 (3):323-6, 1976.
- (154) Rodríguez, C.A., Pelaez, R.J., Nuñez, J. C. y Mora, R. J.: Arginasa y Seromucoide en cirrosis e hígado cardiaco, su integración en el patrón bioquímico de éstas enfermedades. *Rev. Clin. Esp.* 124:567-70, 1972.
- (155) Rodríguez, C. A., Núñez, C. J., Duran, E. C. y Peláez, J. R.: Relaciones arginasa-fosfatasa alcalina. Interés de sus determinaciones en el diagnóstico diferencial de las ictericias. *Rev. Clin. Esp.* 124:489-96, 1972.
- (156) Rodríguez, C. A., Mora, L. R. J., Morata, F. G. y Peláez, R. J.: Accidentes vasculares del encéfalo. Valor de la arginasa sérica en el diagnóstico diferencial. *Rev. Clin. Esp.* 124:369-74, 1972.

- (157) Rodríguez, C. A., Núñez, C. J., Peláez, R. J. y Conde, R.L.: Actividad arginásica en enfermedades cardiopulmonares. Rev. Clin. Esp. 124:263-70, 1972.
- (158) Rodríguez, C. A. y Núñez, C. J.: Actividad de la arginasa sérica en las cirrosis hepáticas. Rev. Clin. Esp. 124:143-50, 1972.
- (159) Rodríguez, C. A., Núñez, C. J., Peláez, J. R. y Mora, R.J: Actividad arginásica en las ictericias obstructivas y hemolíticas. Rev. Clin. Esp. 124:41-6, 1972.
- (160) Noonan, N. E., PhD and Dennis, J. M.: Use of plasma arginase and r-glutamyl transpeptidase as specific indicators of hepatocellular or hepatobiliary deacease in the dog. Am. J. Vet. Res. 140(7):942-7, 1979.
- (161) Van Elsen, A. F. and Leroy, J.G.: Human hyperargininemia: A mutation not expressed in skin fibroblast? Am. J. Hum. Genet 29:350-355, 1977.
- (162) Orfanos, A. P., Naylor, E. W. and Guthrie, R. : Fluorometric Micromethod for determination of arginase activity in dried blood spots on filter paper. Clin. Chem. 26(8):1198-1200, 1980.
- (163) Brown, V.KH and Box, V.L.: The influence of some alicyclic hydrocarbons on the arginase activity of guinea-pig skin. Br. J. Derm. 85: 432-6, 1971.
- (164) Spector, E. B., Kiernan, M., Bernard, B. and Cederbaum, S. D.: Properties of fetal and adult red blood cell arginase. A possible prenatal diagnostic test for arginase

- deficiency. Am. J. Hum. Genet. 32:79-87, 1980.
- (165) Rao, K.V., Pai, S. R. and Bapat, C. V.: The inhibition of arginase by proline in cell-free extracts of mouse mammary tumour. Br. J. Cancer. 30 (2): 129-35, 1974.
- (166) Pace, C.N., Buonanno, A. and Simmons-Hansen, J.: Steady-state kinetic studies of arginase with an improved direct spectrophotometric assay. Anal. Biochem. 109:261-265, 1980
- (167) Eccles, S. A. and Alexander, P. : Sequestration of macrophages ingrowing tumours and its effect on the immunological capacity of the host. Br. J. Cancer 30 (1): 42-49, 1974.
- (168) Synderman, S. E., Sansaricq, C., Norton, P. M. and Goldstein, F.: Argininemia treated from birth. J. Pediatr. 95-61-63, 1979.
- (169) Synderman, S.E., Sansaricq, C., Chen, W. J. and Norton, P. M.: Argininemia. J. Pediatr. 90: 563-568, 1977.
- (170) Cederbaum, S. D., Shaw, K. N. F. and Valente, M. D.: Hiperargininemia. J. Pediatrics. 90:569-573, 1977.
- (171) Cederbaum, S.D., Shaw, K.N.F., Spector, E.B., Verity, M.A. Snodgrass, P. G. and Sugarman, G. I.: Hyperargininemia with arginase deficiency. Pediatr. Res. 13:827-832, 1979.
- (172) Rodríguez, C.J. y Núñez, C.: El enzima arginasa: bioquímica general, metabolismo, interés de la determinación sérica en patología hepática. Rev. Clin. Esp. 123:213-20, 1971.
- (173) Núñez-Carril, J., Rodríguez, C.J., Peláez, R.J., Morata, F.G. y Mora, R.J.: Actividad de la arginasa sérica en

- normales y miscelánea. Rev. Clin. Esp. 123:246-50, 1971.
- (174) Wildy, P., Gell, P.G.H., Rhodes, J. and Newton, A.:
Inhibition of Herpes Simplex Virus Multiplication by
Activated Macrophages: A role for arginase? Infect.
Immun. 37 (1): 40-5, 1982.
- (175) Madsen, N. P. and Hegarty, M. P.: Inhibition of rat liver
homogenate arginase activity in vitro by the hepatotoxic
amino acid indospicine. Biochem. Pharmacol 19:2391-3, 1970.
- (176) Kuchel, P. W., Nichol, L. W. and Jeffrey, P. D. :
Physicochemical and kinetic properties of beef liver
argininosuccinase. Studies in the presence and absence of
arginase. Biochem. Biophys. Acta 397:478-488, 1975.
- (177) Carmichael, L.E.: Identification of a canine adenovirus
(Infectious canine hepatitis virus). Inhibitor in dog liver
extracts as arginase. Infect. Immun. 6:348-54, 1972.
- (178) Nelson, J. A., Carpenter, J. W. and Morris, H. P.: Growth
inhibitory arginase activities in liver and Hepatoma
extracts (38923). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149 (4):900-2
1975.
- (179) Palacios, R., Hutran, C. and Sobera, G.: Preferential
hydrolysis of endogenous arginine by rat liver arginase.
Biochem. Biophys. Res. Commun 38:438-443, 1970.
- (180) Husson, A. et Vaillant, R.: Controle des activités de
l'argininosuccinate synthetase, de l'argininosuccinase et
de l'arginase a la naissance chez le rat. Can. J. Biochem.
56 (7): 734-7, 1979.

- (181) Lamers, W.H. and Mooren, P.G.: Role of sex steroid hormones in the normal and glucocorticosteroid hormone-induced evolution of carbamoyl phosphate synthase (amonia) and arginase activity in rat liver ontogenesis. Biol. Neonate 40: 78-90, 1981.
- (182) Lamers, W.H. and Mooren, P.G.: Role of glucocorticosteroid hormones on the levels of rat liver carbamoyl phosphate synthase (amonia) and arginase activity during ontogenesis. Bio. Neonate. 37:113-137, 1980.
- (183) Lamers, W. H. and Mooren, P. G.: Role of thyroid hormones in the normal and glucocorticosteroid hormone -induced evolution of carbamoyl phosphate synthase (amonia) and arginase activity in perinatal rat liver. Biol. Neonate 37 (56): 264-84, 1980.
- (184) Husson, A. and Vaillant, R.: Effects of glucocorticosteroids and glucagon on arginosuccinate synthetase, arginino succinase, and arginase in fetal rat liver. Endocrinology 110 (1): 227-32, 1982.
- (185) Rabbani, P. and Prasad, A. S.: Plasma ammonia and liver ornithine transcarbamoylase activity in zinc-deficient rats. Am J. Physiol. 235:E203-E-205, 1978.
- (186) White, A. G. and Nachev, P.: Uremic inhibition of purine uptake by rat hepatic slices. Am. J. Physiol. 228:436-440, 1975.
- (187) Rodríguez, C., Núñez, J. C., Peláez, R., y Durán, C. E.: Actividades de arginasa sérica en las hepatitis agudas.

Rev. Clin. Esp. 123:477-82, 1971.

- (188) Parembaska, Z. and Kedra, M.: Early diagnosis of myocardial infarction by arginase activity determination. Clin. Chim. Acta 60 (3): 355-61, 1975.
- (189) Traniello, S., Offorenghi, T. and Grazi, E.: Stimulation by heterologous perfusate of the arginase activity of the chicken liver. Ital. J. Biochem. 26 (4): 264-76, 1972.
- (190) Bedino, S.: Allosteric regulation of beef liver arginase activity by L-ornithine. Ital. J. Biochem. 26 (4): 264-76, 1971.
- (191) Nishibe, H. and Makino, H.: Investigation of arginase isozyme in erythrocyte. Clin. Chim. Acta 34:409-14, 1971.
- (192) McLean, P., Reid, E. and Gurney, M. W.: Effect of azodye carcinogenesis on enzymes concerned with urea synthesis in rat. Biochem. J. 91:463-473, 1964.
- (193) Tanaka, T. and Ogata, K.: Preferential synthesis of arginase by free polysome from rat liver. J. Biochem. (Tokyo); 70:693-7, 1971.
- (194) Hibbs, J. B. Jr., Taintor, R. R., Chapman, H. A. and Jr; Weinberg, J.B.: Macrophage tumor killing. Influence of the environment. Science. 197:279-282, 1977.
- (195) Silva, A. D., Blythe, W.B. and Welt, L. G.: Arginase activity of human erythrocytes ghosts in uremia. Biomedicine (Express) J. 28 (8): 307-9, 1975.
- (196) Yamanaka, H., Shimazaki, J., Imai, K., Sugiyama, Y. and Shida, K.: Effect of estrogen administration on activities

- of Testosterone 5 L-reductase, Alkaline phosphatase and arginase in the ventral and the dorso lateral prostates of rat. *Endocrinol. Jpn.* 22 (4): 297-302, 1975.
- (197) Yamanaka, H., Mayuzumi, T., Shimazadi, J. and Shida, K.: Properties and androgen-induced changes of arginase in kidney and ventral prostate of rats. *Endocrinol. Jpn.* 18:487-494, 1971.
- (198) Stanfield, R., Neufed, E.F., Rogers, S. and Friedmann, T.: Gene therapy for human genetic disease? *Science* 178:648-9, 1972.
- (199) Kesavarao, K. V., Ragliupathi, R. R. and Swami, K.: The inhibition of sheep liver arginase by some L-aminoacids. *Int. J. Biochem.* 4:62-70, 1973.
- (200) Grillo, M. A., Fossa, T. and Dianzani, U.: Arginase, ornithine descarboxylase and S - adenosylmethionine descarboxylase in chicken brain and retina. *Int. J. Biochem.* 15 (8): 1081-4, 1983.
- (201) Muzynska, G. and Wojtczak, M.: Influence of immobilization on conformation of rat liver arginase. *Int. J. Biochem.* 10:665-8, 1979.
- (202) Pau, M. Y. and Milner, J. A.: Arginine deficiency during gestation and lactation in the rat. *J. Nutr.*, 111: 184-93, 1981.
- (203) Azizi, E., Dror, Y. and Wallis, K.: Arginase activity in erythrocytes of healthy and ill children. *Clin. Chim. Acta* 28:391-6, 1970.

- (204) Michelis, V.V. and Beaudet, A. L.: Arginase deficiency in multiple tissues in argininemia. Clin. Genet; 13: 61-67, 1978.
- (205) Pollitt, R.J.: Argininosuccinate lyase levels in blood, liver and cultured fibroblast of a patient with argininosuccinic aciduria. Clin. Chim. Acta; 46: 133-37, 1973.
- (206) Hsu, J.M. and Anthony, W.L.: Effect of zinc deficiency on urinary excretion of nitrogenous compounds and liver amino acid-catabolizing enzymes on rats. J. Nutr. 105:26-31, 1975
- (207) Schimke, R. T.: The importance of both synthesis and Degradation in the control of arginase levels in rat liver. J. Biol. Chem. 239,3808-17, 1964.
- (208) Schimke, R.T.: Differential effects of fastening and protein free diets on levels of urea cycle enzymes in rat liver. J. Biol. Chem. 237, 1921-24, 1962.

-:- TESIS PROFESIONALES -:-

MÉCANOGRAFIA E IMPRESION

Campeche No. 156 - - - - Col. Roma

México, D. F. - - - - 06700

564 - 3954 ★ 584 - 8153