

00381

2ej^o
5.

ALGUNOS ASPECTOS EN LA REGULACION DEL CICLO DE LA UREA

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

QUE PRESENTA EL M. EN C. FRANCISCO ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

ELABORADA EN EL DEPTO. DE BIOQUIMICA DE LA FAC. DE MEDICINA

SEPTIEMBRE DE 1987, FAC. DE CIENCIAS, UNAM

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ANTECEDENTES GENERALES	4
Biosíntesis de arginina en <u>E. coli</u>	9
Biosíntesis de arginina en <u>B. subtilis</u>	11
Metabolismo de la arginina en <u>S. cerevisiae</u>	12
Metabolismo de la arginina en <u>N. crassa</u>	14
Transición de la síntesis de arginina a la síntesis de urea	15
Enzimas mitocondriales en la biosíntesis de la urea:	
Carbamil fosfato sintetasa I	20
Ornitina transcarbamilasa	22
Enzimas extramitocondriales en la biosíntesis de la urea:	
Argininosuccinato sintetasa	28
Argininosuccinasa	30
Arginasa	31
INTRODUCCION	33
MATERIALES Y METODOS	35
RESULTADOS	37
TRANSPORTE DE ORNITINA EN MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA: EFECTO DEL CALCIO Y LA ARGININA	50
EFECTO DE LA D-ARGININA EN HIGADO DE RATA	58
BIBLIOGRAFIA	61

RESUMEN

Este trabajo presenta algunos aspectos metabólicos que influyen en la regulación de la biosíntesis de la urea en hígado de mamífero.

Se analizó el efecto del glucagón y el cortisol sobre la respiración, fosforilación y la síntesis de citrulina en mitocondrias aisladas de hígado de rata. En ausencia de hormonas, la oxidación de succinato y la actividad fosforilante de las mitocondrias (aisladas en manitol) aumentaron 22% y 10% respectivamente, comparados con el incremento observado en las mitocondrias aisladas con sacarosa. Los resultados del análisis de la síntesis de citrulina no mostró diferencias significativas en las mitocondrias aisladas en manitol o sacarosa. El control respiratorio con succinato de las mitocondrias de hígado de rata tratadas con glucagón y aisladas con manitol aumentó 27% con respecto de las mitocondrias obtenidas en sacarosa. La fosforilación y la síntesis de citrulina no tuvieron diferencias significativas en las mitocondrias de hígado tratadas con glucagón y obtenidas en sacarosa o en manitol, pero las mitocondrias provenientes de ratas tratadas con glucagón sintetizan más citrulina que las mitocondrias de los animales no tratados. En las mitocondrias de hígado tratadas con cortisol y aisladas en manitol, el control respiratorio con succinato como sustrato, aumentó 37% con respecto de las mitocondrias aisladas en sacarosa; el efecto del cortisol sobre la relación ADP:O y la síntesis de citrulina no mostró diferencias significativas en los

resultados obtenidos con mitocondrias aisladas en sacarosa o en manitol; pero el tratamiento con cortisol aumentó en un 60% la síntesis de citrulina.

La presencia de la actividad de la arginasa como contaminante en la preparación de mitocondrias de hígado de rata se demostró en un ensayo para síntesis de citrulina al sustituir en la mezcla de incubación la ornitina (uno de los sustratos) y reemplazar por arginina 10 mM con lo que se obtuvo un aumento en la citrulinogénesis de 200 veces. Por medio de lavado con KCl 150 mM, o con ficoll al 20%, se logró eliminar 50% de la actividad de la arginasa como contaminante de las mitocondrias. Cuando se ensayó en forma conjunta el lavado con ficoll al 20% y la adición del inhibidor de la arginasa, norleucina, se obtuvo un 87% en la eliminación de la actividad de la arginasa. Estas fueron las condiciones experimentales que se utilizaron para observar el posible efecto de la arginina sobre el transporte de la ornitina hacia la mitocondria.

En la segunda parte de esta tesis se estudió el efecto del calcio y la L-arginina sobre el transporte de ornitina por mitocondrias de hígado de rata. La adición de calcio 0.36 μ M en ausencia de arginina, aumentó la captación de ornitina 218% sobre el control. A concentraciones mayores de 1 μ M del metal, la captación del aminoácido disminuyó. Cuando se mantuvo constante la concentración de calcio en el medio de incubación (0.36 μ M), el transporte de ornitina se elevó 188% en presencia de L-arginina 5 μ M y luego disminuyó a mayores concentraciones de arginina.

El tercer aspecto metabólico que se estudió en relación con la regulación del ciclo de la urea fue el efecto que tiene la D-arginina en el hígado de la rata. La D-arginina (200 a 400 μ M) estimuló la ureogénesis en hepatocitos de rata y la citrulinogénesis (10 a 70 μ M) en mitocondrias de hígado. Sin embargo, con altas concentraciones de D-arginina (800 μ M) en hepatocitos, la síntesis de urea disminuyó; de igual forma, en mitocondrias de hígado, la D-arginina en altas concentraciones (100 μ M), disminuyó la síntesis de citrulina.

Podemos concluir que el efecto de las hormonas glucagon y el cortisol sobre la respiración de mitocondrias de hígado obtenidas en manitol como medio de aislamiento aumentó en relación con las mitocondrias obtenidas en sacarosa; no se obtuvieron diferencias significativas en la fosforilación y en la síntesis de citrulina de mitocondrias de hígado de rata tratada con glucagon o cortisol. Se demostró la presencia de la actividad de la arginasa como contaminante en las mitocondrias de hígado, debido al aumento en la síntesis de citrulina al utilizar arginina en lugar de ornitina como sustrato y el tratamiento más eficaz para eliminar dicha actividad, fue el lavado de las mitocondrias con ficoll al 20% y la adición de norleucina como inhibidor de la arginasa, durante el ensayo de síntesis de citrulina. Se demostró que el calcio y la L-arginina estimulan el transporte de la ornitina hacia la mitocondria y por último la participación directa del aminoácido D-arginina sobre la ureogénesis y la citrulinogénesis en hígado de mamífero.

ANTECEDENTES GENERALES.

A través de la historia de la vida, ha ocurrido la formación de ciertas sustancias, las cuales por su distribución en la naturaleza poseen características generales y particulares que les confieren gran significado cualitativo. La urea es una de esas sustancias; se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en el reino vegetal como en el reino animal, así como en microorganismos eucariontes primitivos como la levadura.

La fermentación amoniacal de la orina era perfectamente conocida en la antigüedad, así como la formación del carbonato de amonio o el " espíritu de la orina ", el cual fue ampliamente usado como medicamento en la terapéutica medieval. En el siglo XVI, Nicholas Lemery (1) y posteriormente Scheele, reconocieron la existencia de una sustancia formadora de amoniaco en la orina; sin embargo, fue en 1773 cuando la urea fue descubierta por Rouelle (2), al evaporar cuidadosamente en presencia de etanol una muestra de orina. El material extraído fue descrito como " una sustancia jabonosa, atrapadora de agua, que era capaz de cristalizar y que además contenía más de la mitad de su peso como alcali volátil, rica en nitrógeno y que mediante fermentación formaba ácido carbónico y amoniaco ". Por otro lado, fueron Fourcroy y Vaquelin (3) quienes utilizaron por primera vez el término urea en " ese material especial de la orina, que origina ácido carbónico y amoniaco en orina en descomposición ".

Prévost y Dumas (4), en 1833, demostraron por primera vez la presencia de urea en sangre a partir de un extracto etanólico

caliente de sangre de perros y gatos nefrectomizados; el análisis elemental del material cristalino les permitió concluir que la urea de la sangre era idéntica a la urea de orina. Posteriormente y mediante experimentos adicionales llegaron a las siguientes conclusiones: a) la cantidad de urea excretada por vía renal era una medida cuantitativa de su formación. b) cuando se lleva a cabo una nefrectomía total, se acumula urea en la sangre. c) debido a que se encuentra amonio en la sangre en casos de hepatitis crónica, posiblemente el hígado debe estar involucrado en la formación de urea (citado en 5).

El primer análisis de la urea con su correspondiente y correcta fórmula empírica fue logrado por Prout en 1824 (citado en 6). En 1828 se demostró la formación de urea a partir del calentamiento de cianato de amonio por el químico alemán Federico Wohler en la ciudad de Gotinga (7); esta observación tuvo un fuerte impacto no solo en la teoría del vitalismo y el concepto del isomerismo, sino en el por qué de la formación de la urea en el organismo humano; durante este período fueron publicados numerosos reportes en los cuales se trataba de observar la formación de cianato (o carbamato) de amonio frente a una amplia variedad de sistemas, dentro de los cuales se podía incluir calentamiento de aminoácidos y proteínas con agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno, permanganato y carbón activado (8).

La hipótesis de que el carbamato de amonio o algunos compuestos relacionados estarían involucrados en la biosíntesis de la urea, persistió por más de 100 años (8). Hay que hacer notar que en el artículo de Krebs y Henseleit (9), en el cual se

describe la síntesis de la urea, se puso en duda si el cianato de amonio en un sistema de rebanadas de hígado, podría ser un precursor de la urea, pero no se obtuvo nada, por lo tanto, concluyeron que el cianato de amonio no puede ser intermediario ni precursor en la biosíntesis de la urea en el organismo.

Para 1939 el Dr. Krebs estaba plenamente convencido de que se requerían las células hepáticas íntegras para llevar a cabo la síntesis de la urea a partir de amoníaco y bióxido de carbono, debido a experimentos que fallaron para sintetizar urea en preparaciones libres de células. En 1944, M. Hayano (10) en el laboratorio del Dr. P.F. Cohen logra sintetizar urea en " un sistema libre de células " y demuestra : 1) síntesis de citrulina a partir de amoníaco y bióxido de carbono en una fracción cruda de hígado (posteriormente reconocida como de mitocondrias) y 2) la conversión de citrulina en urea en la fracción del sobrenadante. Posteriormente Grisolia y Cohen (11), al utilizar la fracción cruda de hígado, descubren la existencia de dos pasos enzimáticos en la biosíntesis de citrulina a partir de amoníaco y CO₂, además del requerimiento de un compuesto N-acil, derivado del ácido glutámico, al cual llamaron compuesto X. Más tarde, Jones, Spector y Lipmann (12), en 1955, identificaron al carbamil fosfato como el donador de grupos carbamilo en la síntesis enzimática de citrulina, que correspondía al compuesto X de Grisolia y Cohen (11).

En 1958 se tenían plenamente identificadas las enzimas mitocondriales involucradas en la biosíntesis de citrulina : la carbamil fosfato sintetasa I (CPS I), denominada así para distinguirla de la CPS II involucrada en la biosíntesis de

pirimidinas y la ornitina transcarbamilasa (OTC), que representan el primero y segundo pasos respectivamente en la biosíntesis de la urea a partir de amoníaco y bióxido de carbono (fig. 1).

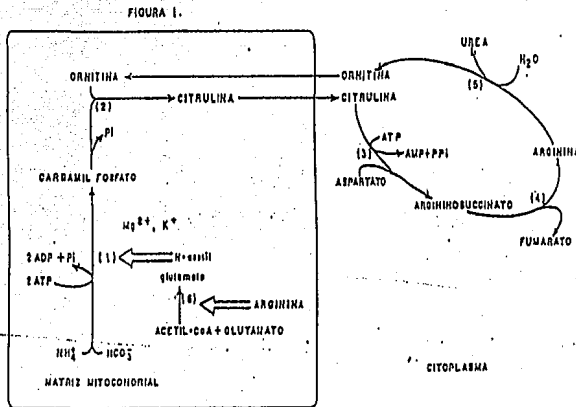


Fig. 1: El Ciclo de la Ornitina: Las enzimas participantes están con número: (1) Carbamil fosfato sintetasa I. (2) Ornitina transcarbamilasa. (3) Argininosuccinato sintetasa. (4) Argininosuccinasa. (5) Arginasa. (6) N-acetil glutamato sintetasa.

Para entender mejor un proceso bioquímico, además de examinar su contexto metabólico actual, también es conveniente analizar su historial evolutivo. Tal es el caso de la biosíntesis de la urea, o ciclo de la ornitina, el cual a través de millones de años ha sufrido cambios evolutivos drásticos en el contexto metabólico de los procesos bioquímicos; algunas de sus características metabólicas aún cuando permanecieron sin variación durante mucho tiempo, pudieron desempeñar funciones diferentes de las actuales; el ciclo de la ornitina (fig. 1) representa una vía metabólica extremadamente eficiente para la conversión de amoníaco y bióxido de carbono en urea. Sin duda, estas reacciones fueron producto de

una dura y estricta presión de selección, debido a la toxicidad del amonio para los organismos vertebrados; sin embargo, existen ciertos aspectos del ciclo de la ornitina relacionados con su regulación que no han sido perfectamente esclarecidos.

Ejemplo I: Al examinar la localización intracelular de las reacciones del ciclo de la ornitina, encontramos que las enzimas que catalizan dos de las reacciones: la carbamil fosfato sintetasa I (CPS I) y la ornitina transcarbamilasa (OTC), ambas se encuentran en la matriz mitocondrial, mientras que las otras tres enzimas: la argininosuccinato sintetasa, la argininosuccinasa y la arginasa, se encuentran en el citoplasma. Como resultado de esta distribución, la membrana mitocondrial es una barrera para la operación del ciclo y para ello se necesitan dos eventos adicionales en la membrana catalizados por proteínas específicas: el transportador de la ornitina hacia la mitocondria, compensado con la salida de protones (13) y la difusión facilitada de citrulina a través de la membrana intramitocondrial (14). Por otro lado, la síntesis y utilización de carbamil fosfato (CP) en la mitocondria está relacionada con la separación de las pozas de CP para la biosíntesis de la urea y las pirimidinas y además está relacionada con la regulación de su síntesis; sin embargo, está claro que los objetivos arriba mencionados se podrían llevar a cabo, si todas las reacciones del ciclo de la ornitina fueran intramitocondriales, situación que tendría como ventaja el no requerir las proteínas acarreadoras de ornitina y citrulina, así como la separación de las pozas de CP, el cual está involucrado en la biosíntesis de la urea y las

pirimidinas.

Ejemplo II: Se debe observar la regulación de la síntesis de CP por N-acetil glutamato (NAG), así como su degradación. La acetilación del glutamato es mediante la enzima mitocondrial N-acetil glutamato sintetasa, la cual es activada por arginina (15) y el producto, el NAG, es el activador esencial de la CPS I (11). Como resultado de esto, la síntesis de CP está en función de las concentraciones mitocondriales de arginina y glutamato (16), aunque también está directamente modulada por la ornitina (17,18).

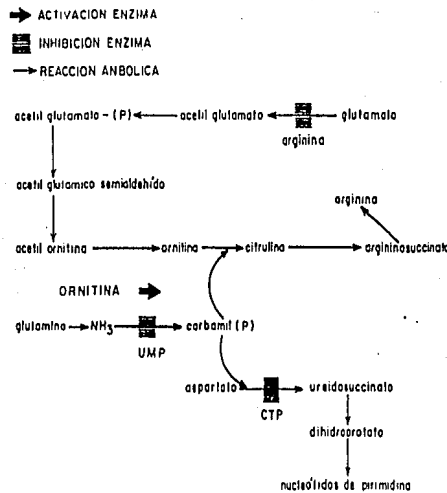
Algunos aspectos del ciclo de la urea que serán considerados, fueron determinados en buena parte por su origen evolutivo. Con excepción de la arginasa, el resto de las reacciones enzimáticas participa, además de la síntesis de la urea, en la síntesis de arginina, así que se tratará de reconstruir una secuencia progresiva de cambios evolutivos del ciclo de la urea en microorganismos.

BIOSÍNTESIS DE LA ARGININA EN Escherichia coli.

La selección natural puso como prueba la eficiencia mediante la cual la bacteria pudiera utilizar nutrimentos para crecer y luego para dar lugar a la aparición de mecanismos de control de las vías biosintéticas. Como resultado de esto, generalmente la primera enzima de una vía biosintética está sujeta a inhibición por medio del producto final (retroalimentación negativa) de dicha vía; en el caso de la biosíntesis de la arginina en Escherichia coli (fig. 2) se presenta la inhibición alostérica de la N-acetil glutamato

sintetasa por la arginina (19), sin embargo, el control de la biosíntesis de la arginina enfrenta un problema debido a que su regulación está ligada a la regulación de la biosíntesis de pirimidinas, debido a que ambas vías comparten un alimentador común, el carbamil fosfato (fig. 2). Por un lado, el CP se une al aspartato, en una reacción catalizada por la aspartato transcarbamilasa; dicha reacción es inhibida alostéricamente por CTP (20). A su vez, la síntesis de CP, catalizada por la carbamil fosfato sintetasa I es inhibida por UMP y estimulada por ornitina (21). Se ha integrado toda esta información en la figura 2 con el objeto de entender mejor los detalles de la regulación de la biosíntesis de la arginina.

FIGURA 2.- METABOLISMO DE ARGININA EN *Escherichia coli*.



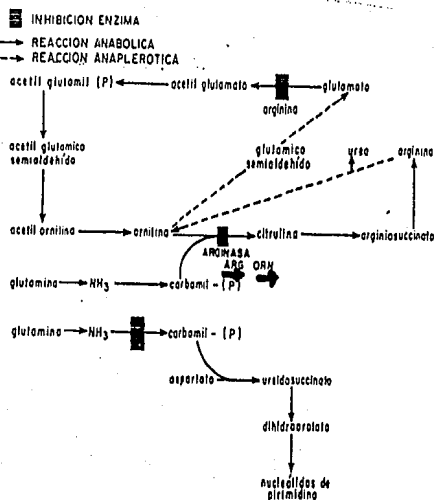
Así, cuando la célula esté sintetizando activamente arginina, se formará suficiente ornitina para activar la síntesis de CP y un exceso de CTP impedirá su paso hacia las pirimidinas, mientras que una falta de CP lo facilitará. En otro caso, un exceso de UMP causará una disminución en la síntesis de CP y la ornitina se

acumulará al no poderse acoplar con el propio CP, de esta forma, el exceso de ornitina activará la sintetasa de carbamil fosfato I y lo hace disponible para la síntesis de citrulina y arginina. Por otro lado, un exceso de arginina dá lugar a que la síntesis de ornitina pueda ser inhibida y así el control de la activación de la ornitina transcarbamilasa depende en gran medida de los sustratos.

BIOSINTESIS DE LA ARGININA EN *Bacillus subtilis*.

En estas bacterias el control en la biosíntesis de la arginina y el control en el metabolismo del carbamil fosfato está sujeto a elementos adicionales, debido a la presencia de una vía catabólica para la arginina (fig. 3), la cual incluye su hidrólisis en ornitina y urea por la aparición de la enzima arginasa y la posterior utilización metabólica de la ornitina para sintetizar semialdehído glutámico y luego glutamato (22).

FIGURA 3: METABOLISMO DE ARGININA EN *Bacillus subtilis*.



Debido a que la ornitina es un intermediario tanto

biosintético como catabólico, su concentración no puede ser usada para controlar la biosíntesis de CP como sucede en E. coli; consecuentemente B. subtilis tiene una forma más compleja de regulación en la biosíntesis de CP, ya que incluye la aparición de dos carbamil fosfato sintetetas distintas (23).

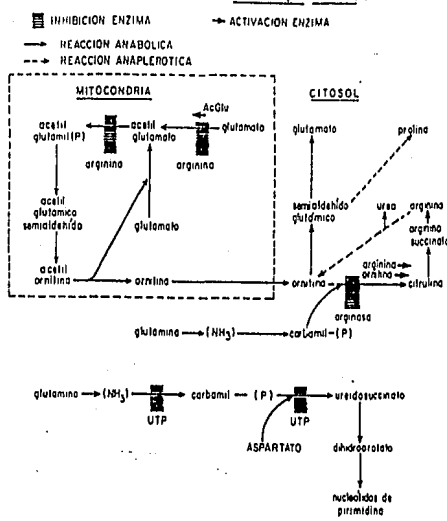
La enzima que funciona específicamente en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidinas (CPS II) es controlada por UMP, así, la utilización de CP por esta enzima no requiere regulación posterior. La otra carbamil fosfato sintetasa (CPS I) es codificada por un gene diferente, no está sujeta a control alostérico y el sitio primario de regulación de la biosíntesis de la arginina es por retroalimentación negativa de la N-acetil glutamato sintetasa por L-arginina. Existe además otro punto de control para evitar una acumulación de arginina y es la presencia de la enzima catabólica arginasa, la cual forma ornitina y urea, lo que genera una nueva posibilidad de biosíntesis de arginina debido a que la ornitina reacciona con el CP para dar origen a la citrulina y de esta forma alimentar la síntesis de arginina. De hecho, existe una estrecha relación entre la arginasa y la ornitina transcarbamilasa; estas dos enzimas tienen pesos moleculares muy similares (24) y además son trimeros (25). La interacción de estas dos enzimas dá lugar a la formación de un hexámero, como es el caso concreto que presentan la arginasa y la ornitina transcarbamilasa de Streptococcus faecalis (24) y las de Bacillus licheniformis (27).

METABOLISMO DE LA ARGININA EN Saccharomyces cerevisiae.

Una diferencia fundamental entre procariontes y

eucariontes es la presencia en eucariontes de organelos celulares como las mitocondrias y el núcleo; como resultado, estas células tienen la oportunidad de compartimentalizar aún más sus vías metabólicas. Al comparar el metabolismo de la arginina en *B. subtilis*, con el del eucarionte primitivo *S. cerevisiae* (fig. -4), se observa que las mayores diferencias se encuentran, no en la naturaleza de las reacciones, sino en su organización dentro de la célula. Para el caso de *S. cerevisiae*, los primeros pasos de la vía que dan lugar a la formación de ornitina suceden en la mitocondria, mientras que la conversión de ornitina en arginina, así como el catabolismo de la arginina, suceden en el citoplasma (28).

FIGURA 4. METABOLISMO DE ARGININA EN *Saccharomyces cerevisiae*.



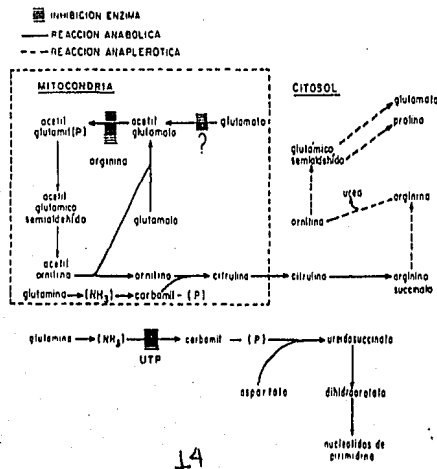
Al comparar *B. subtilis* con la levadura *S. cerevisiae* observamos que: 1) la levadura posee dos carbamil fosfato sintetetas que funcionan en dos compartimentos intracelulares diferentes, tanto en la biosíntesis de pirimidinas como en la biosíntesis de arginina y 2) la actividad biológica de la

arginasa y la ornitina transcarbamilasa de levadura se desarrolla en forma simultánea mediante la formación de un complejo uno a uno entre estas dos enzimas (29); como se conoce que en *B. subtilis* existe también este tipo de interacción entre estas dos enzimas, es de interés observar este mecanismo de control encontrado en dos especies no relacionadas entre sí. El principal hecho que se observa es que ambas enzimas tanto en *S. cerevisiae* como en *B. subtilis* son trimeros, lo que hace pensar en una estrecha relación evolutiva basada en la observación de que la arginasa de *S. cerevisiae* es capaz de interactuar y además de regular la actividad de la OTC de *B. subtilis* (30).

METABOLISMO DE LA ARGININA EN *Neurospora crassa*.

Tanto la biosíntesis como la degradación de la arginina son similares en *S. cerevisiae* y en *N. crassa*. También en *Neurospora* (fig. 5) se aprovecha la ventaja de la compartimentalización que le ofrece la mitocondria en donde, al menos, dos enzimas de la biosíntesis de la arginina se encuentran en este organelo (31,32).

FIGURA 5. METABOLISMO DE ARGININA EN *Neurospora crassa*.



Dado que el catabolismo de la arginina se lleva a cabo en el citoplasma y el flujo de ornitina a través de la membrana mitocondrial es restringido en la vía catabólica de la ornitina, ésta no puede ser carbamylada y convertida en arginina en un grado significativo ni tampoco puede ser degradada (33). Aquí no existe evidencia de que interaccionen la arginasa con la OTC, aunque la arginasa de Neurospora crassa tiene el doble de peso molecular respecto de la de levadura (34) y parece poco probable la interacción de una proteína hexamérica con el trimero de la OTC (30); además, influye la localización intramitocondrial específica para la CPS I a diferencia de la CPS II, la cual está relacionada con la biosíntesis de nucleótidos de pirimidinas y está localizada en el citoplasma.

Al comparar la regulación de la actividad de la aspartato transcarbamilasa de S. cerevisiae y la de N. crassa, se observa en ambas especies que la síntesis de carbamil fosfato y la carbamylación del aspartato son catalizados por una sola proteína bifuncional (36). En Neurospora, sólo la síntesis de CP es controlada por UTP (37), por lo tanto, el control de la aspartato transcarbamilasa de Neurospora no parece ser del todo ventajoso.

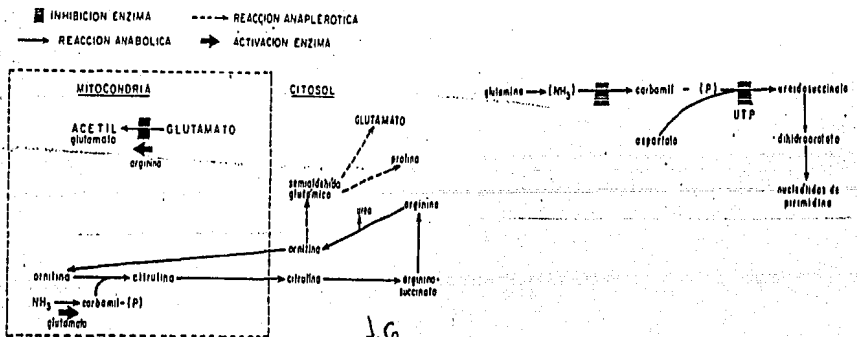
TRANSICION DE LA SINTESIS DE ARGININA A LA SINTESIS DE UREA.

El principal hecho evolutivo que ocurrió en los microorganismos fue la pérdida de la capacidad de sintetizar arginina y la adquisición de la capacidad de sintetizar urea. Esto es de vital interés, en vista de la posibilidad de que la síntesis de arginina puede ser antecedente evolutivo en la

síntesis de urea, puesto que los dos procesos tienen reacciones en común; desafortunadamente la distribución del ciclo de la urea en el reino animal ha sido estudiada con más detalle que la biosíntesis de arginina; de cualquier manera, se ha encontrado una forma funcional del ciclo de la ornitina en el gusano *Bipalium kewense*, lo cual sugiere que la biosíntesis de la urea sobrevino en la era de los metazoarios, época geológica a la cual se atribuye la existencia de este tipo de gusano (38).

Al comparar el metabolismo de la arginina en *N. crassa* con el del hígado de mamífero (fig. 6), se analizan los cambios que se requieren para la transformación de la biosíntesis de arginina a la vía de síntesis de urea. Han sido pocos los cambios requeridos; en el hígado no existe el ciclo del N-acetil glutamato tal como aparece en *N. crassa* (fig. 5); la adquisición de una proteína acarreadora de ornitina en la membrana intramitocondrial del hepatocito (13) la cual no ha sido hallada en *Neurospora*; en el mamífero, la N-acetil glutamato sintetasa es activada por la arginina, en lugar de inhibir su actividad como en *Neurospora*. Por último, se observan cambios en la regulación de la CPS I, la cual se activa por N-acetil glutamato (NAG) en hepatocitos, mientras que en el hongo, ocurre una pérdida de dependencia de glutamina para su actividad.

FIGURA 6. METABOLISMO DE ARGININA EN HIGADO DE MAMIFERO.



Examinemos la secuencia de pasos que se originaron desde el metabolismo de la arginina en hongos, hasta la síntesis de urea en mamíferos:

1. El estricto control de la biosíntesis de la arginina debido a la regulación específica de la actividad de la CPS I por N-acetil glutamato, que coordina el flujo de síntesis de CP con el flujo de síntesis de acetil glutamato y posteriormente con la síntesis de ornitina.

2. La reducción gradual del número de enzimas involucradas en la biosíntesis de la arginina, así como el cambio en el habitat nutricional de los eucariontes al cambiar la utilización de simples compuestos orgánicos a la citofagia. La ingesta de arginina en la dieta hizo menos crítica la posesión de la vía biosintética de arginina, así como de otros aminoácidos; probablemente la reducción de los niveles enzimáticos se debió más a cambios mutacionales regulados, es decir que a las alteraciones estructurales de los genes. Ejemplos de cambios mutacionales regulados, que a través del tiempo, la expresión de los genes estructurales específicos ha sido desplazada, son conocidos tanto en procariontes (39), como en eucariontes (40).

3. El siguiente paso fue, tal vez, el aumento de permeabilidad de la membrana intramitocondrial para la ornitina; lo que sucedió, probablemente, por el aumento de la proteína acarreadora (41), o por la pérdida de un mecanismo inhibitor específico. Por otro lado, la ruta catabólica de la ornitina a glutamato y prolina, es relativamente reversible (42). La habilidad de la ornitina para entrar a la mitocondria podría proporcionar una ruta alterna para la biosíntesis de arginina

cuando se suprimiera este aminoácido.

4. Tuvo que ser provocado un cambio en el camino metabólico de la urea. En eucariontes primitivos, la urea era relativamente poco usada, inclusive algunas especies utilizaban urea como única fuente de nitrógeno (22); sin embargo, en algún estadio evolutivo, la producción de urea contribuyó a la regulación de la ósmosis de los fluidos en organismos para poder sobrevivir en medios salinos y probablemente despues como un mecanismo de excreción de nitrógeno en medios no acuosos; así, la función primaria de las reacciones involucradas cambiaron de la biosíntesis a la degradación de la arginina por la síntesis de la urea.

La capacidad para sintetizar urea apareció en forma temprana en los organismos durante su evolución, pero no se desarrolló completamente como un mecanismo bioquímico hasta que surgieron problemas como abastecimiento limitado de agua, así como la demanda para excretar ciertas sustancias, características que fueron impuestas por diversos caminos metabólicos.

Huggins y col. (43), sugirieron la siguiente terminología para describir aquellos animales capaces de sintetizar urea a partir de amoníaco y bióxido de carbono. Ureogénicos: aquellos animales que sintetizan urea, pero no necesariamente la excretan como el principal producto nitrogenado por la orina. Ureotélicos: aquellos animales que forman urea, la cual excretan como el principal producto nitrogenado. Ureosmóticos: aquellos animales que forman urea y la retienen para mantener el balance osmótico. Amonotélicos: aquellos animales que sintetizan amoníaco como principal producto

de su catabolismo nitrogenado y lo excretan al agua.

Uricotélicos: aquellos animales que excretan ácido úrico como principal producto nitrogenado.

El amoniaco es una sustancia tóxica, aún en concentraciones relativamente bajas; sin embargo, no es problema mantener bajas las concentraciones en un organismo no es problema cuando hay suficiente agua en el medio. En el caso de los animales terrestres, éstos tienen un aporte limitado de agua por lo que es necesario desarrollar los sistemas enzimáticos para la conversión de amoniaco en compuestos relativamente menos tóxicos, como la urea y el ácido úrico (44). Los mamíferos marinos y otros animales que regresaron al mar retuvieron sus patrones característicos para la excreción de sustancias tóxicas (45). Aún cuando se tienen evidencias de que las enzimas necesarias para la síntesis de la urea ya existían en algunos organismos primitivos, no se tiene una explicación adecuada sobre la evolución molecular de dichas enzimas desde los organismos amonotélicos, pasando por los ureotélicos y los uricotélicos en vertebrados superiores. Brown y Cohen (46) han propuesto la hipótesis de la pérdida de las enzimas de la biosíntesis de la urea, como una explicación de la falta de ureotelismo en algunos de esos vertebrados superiores, en la cual se intenta hacer una descripción del tema, en lugar de dar una explicación del proceso evolutivo, y en donde, además, los rearrreglos genéticos y puntos de mutación que afectaron a los genes reguladores, surgieron como una serie de eventos que se manifestaron como una evolución, más que una serie de cambios como simples mutaciones o pérdidas (47).

ENZIMAS MITOCONDRIALES EN LA BIOSINTESIS DE LA UREA.

CARBAMIL FOSFATO SINTETASA I.

1. Propiedades físicas: La enzima carbamil fosfato sintetasa I (CPS I) (E.C.6.3.4.16) está presente en la matriz mitocondrial del hígado de animales ureotéticos y además requiere en forma absoluta de N-acetil glutamato (NAG) como activador (48). La activación de la enzima por NAG (Km aproximada 0.1 mM) en hígado de rata (49), está asociada con cambios en la conformación y estructura de la subunidad de la enzima (50). La CPS I ocupa un 20% del total de la proteína mitocondrial (51), comparado con la cantidad de ATPasa presente en la membrana interna mitocondrial, la cual ocupa un 30% del total de la proteína. La concentración de CPS I es muy elevada aun cuando no está relacionada con la función bioenergética mitocondrial. Se ha encontrado además en cantidades bajas, pero metabólicamente activas, en la mucosa intestinal de animales ureotéticos (52). Ha sido purificado un anticuerpo monovalente contra la CPS I de algunas especies de animales ureotéticos, lo que sugiere que las enzimas de todas estas especies tienen determinantes comunes, así como estructuras similares.

Las enzimas purificadas de hígado de rana, bovino y rata, existen como un sistema monómero-dímero con PM de 160,000 para la forma monomérica (50,54 a 56) (Tabla I).

2. Estequiometría y requerimientos enzimáticos: La CPS I cataliza la formación de un mol de carbamil fosfato, dos moles de ADP y un mol de fosfato inorgánico a partir de un mol de amoníaco, un mol de bicarbonato y dos moles de ATP.

TABLA I: PROPIEDADES DE LA CARBAMIL FOSFATO SINTETASA I
Y LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA.

	CPS I	OTC
% de proteínas de la matriz.	20	0.5-0.6
P.H. del polímero.	300,000	112,000
Número de subunidades.	2 (idénticas).	3 (idénticas).
P.H. subunidad.	160,000.	36,000.
P.H. del precursor de la subunidad.	165,000.	39,500.
Concentración subunidad en mito. (mmol/L).	1-1.5	0.15
pH óptimo.	6.8-7.6	7.9
Actividad específico. (unid./mg. prot.).	35	900
Km (mmol/L):		
amonio.	2.0	-----
bicarbonato.	5.0	-----
Hg-ATP.	1.0	-----
N-acetil glutamato.	0.1	-----
Hg ²⁺	0.17	-----
ornitina.	-----	0.4
carbamil fosfato.	-----	0.026

El NAG se requiere como cofactor (48); ésto es muy importante, porque es mucha la proteína que se encuentra inactiva sin el cofactor, es decir, se trata de un cofactor obligatorio y por lo tanto, la enzima es totalmente dependiente de él. Además se requieren iones magnesio Mn^{2+} o Co^{2+} (48). La Km para el amonio disminuye significativamente en presencia de iones potasio (48). Hay que hacer notar que la CPS I es la única enzima del ciclo de la urea que tiene un cofactor regulador, y la única enzima que utiliza 2 moles de ATP.

3. Cinética y mecanismo: Se han reportado estudios cinéticos con CPS I de hígado de rana (57), hígado de bovino (49,58) e hígado de rata (59). Los estudios más completos son los reportados con CPS I de bovino, en los cuales se indica inclusive el orden de unión del sustrato y el cofactor al unirse con la

enzima, el cual es: 1) N-acetil glutamato, 2) Mg-ATP, 3) HCO_3 , 4) Mg-ATP, 5) NH_4 . El orden de liberación del producto es: 1) carbamil fosfato, 2) Mg-ADP, 3) Mg-ADP, 4) fosfato inorgánico. Se ha presentado evidencia de la formación de un compuesto enzima-carboxi-fosfato, el cual requiere dos moles de Mg-ATP (60).

4. Papel del N-acetil glutamato: Inicialmente en las preparaciones crudas de hígado se observó la necesidad de un cofactor derivado del glutamato (ii) para la activación de la CPS I. Después de diferentes ensayos con derivados y análogos del glutamato, se encontró que el NAG es el más activo.. El sistema enzimático que cataliza la síntesis de NAG a partir de L-glutamato y acetil coenzima A, ha sido descrito por Tatibana y col. (61); de esta manera, el NAG actúa como un efector alostérico que influye en la asociación-disociación del complejo monómero-dímero de la CPSI (62), el cual ha sido considerado como el primer regulador alostérico que se le haya descrito.

B) ORNITINA TRANSCARBAMILASA.

El descubrimiento de la existencia de una segunda enzima que interviene en la conversión de bióxido de carbono y amoníaco en citrulina, fue mediante las siguientes observaciones: 1) el residuo de hígado de rata que fue incubado en ausencia de ornitina, dió lugar a un intermediario inicialmente llamado compuesto X (ii) y posteriormente carbamil fosfato (12). 2) cuando se calienta el residuo de hígado de rata, se inactiva la enzima que cataliza la formación del intermediario para formar citrulina (ii).

La ornitina transcarbamilasa (OTC) se encuentra

exclusivamente en mitocondrias de higado de animales ureotéticos (Tabla I) al igual que la CPS I; una baja, pero metabólicamente significativa actividad se ha encontrado en la mucosa intestinal de animales ureotéticos (52,63).

1. Propiedades físicas: La OTC ha sido purificada de higado de bovino por Marshall y Cohen (64 a 66), quienes establecieron que la enzima es un trimero de PM 108,000 con tres subunidades idénticas de 36,000 daltones. También ha sido purificado de higado de rata (67) y de higado de humano (68,69), se han establecido características similares con la OTC de bovino. El mecanismo de la reacción establecido con la OTC de bovino implica primeramente la unión de la enzima con el carbamil fosfato, formándose un complejo binario cuando la concentración del sustrato está cercana al valor de su Km (65). También se ha demostrado recientemente la presencia de un grupo sulfhidrilo, así como un residuo de arginina, en el sitio de unión del carbamil fosfato con la enzima (70).

EFECTOS DE METABOLITOS MITOCONDRIALES SOBRE LA CPS I Y LA OTC.

El sistema de la CPS I puede ser afectado por la concentración intramitocondrial de ATP, amoniaco, bicarbonato, Mg²⁺ y N-acetil glutamato. Para el caso de la acetil coenzima A y el L-glutamato, que son sustratos para la síntesis del NAG, esta reacción se hace dependiente de la oxidación de piruvato y de ácidos grasos para generar acetil-CoA, mientras que la deshidrogenasa glutámica y las transaminasas deben mantener los niveles de glutamato. La reacción de síntesis de NAG sucede dentro de la mitocondria, mientras que su degradación sucede en

el citoplasma y de una manera rápida (71); debido a ello, la poza, balance entre la síntesis y la degradación del NAG, es de vital importancia, porque este cofactor de la enzima CPS I debe estar presente para activarla. Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de L-arginina intramitocondrial es indispensable para la síntesis del NAG, ya que funciona como un efector positivo de la N-acetil glutamato sintetasa (15).

EFFECTOS HORMONALES EN LA BIOSÍNTESIS DE LA UREA Y DE LA CITRULINA.

Algunas de las hormonas que afectan los niveles de las enzimas responsables en la biosíntesis de la urea, son: los corticosteroides (72,73), el glucagón (73,74), la hormona del crecimiento (75), la hormona tiroidea (76,77), así como también el segundo mensajero intracelular AMPc (73,74,78). Los sistemas que han sido utilizados son: hígado de feto de rata (78), hígado de feto humano (79), mitocondrias y células aisladas de hígado (73,74,80), animales intactos (ratas y ranas) (72,75), así como preparaciones de hígado de rana (76,81).

En el caso del renacuajo, el primer efecto detectado después de la adición de tiroxina, es la inducción de la enzima CPS I (76), además de un aumento coordinado en las otras enzimas dedicadas a la biosíntesis de la urea (82). La metamorfosis en los anfibios corresponde a la transición entre el renacuajo acuático (amonotélico) y la rana terrestre (ureotélico) y ya que el amonotelismo es incompatible con la vida terrestre debido a los efectos tóxicos potentes del amoníaco, es necesario desarrollar cierta capacidad metabólica como el ureotelismo para detoxificar de amoníaco al anfibio en su metamorfosis temprana,

antes de que el renacuajo deje su medio ambiente acuático.

Por otro lado, existen estudios orientados a dilucidar los efectos que ejercen algunas hormonas como el glucagon, el cortisol y la adrenalina sobre el metabolismo hepático en mamíferos. Entre algunos de ellos encontramos la estimulación por el glucagon de la gluconeogénesis (83 a 85) y de la ureogénesis. Por ejemplo, se ha demostrado en hígado perfundido que el glucagon aumenta la producción de urea a partir de aminoácidos (86), aparentemente debido al aumento en la degradación de los aminoácidos, que por lo tanto, incrementa la cantidad de sustratos para la síntesis de la urea. También se ha encontrado que en hepatocitos aislados de rata, el glucagon incrementa la síntesis de urea a partir de un exceso de amonio (10 mM) (87), lo cual indica que el paso limitante en la síntesis de la urea a partir de amoniaco como sustrato, está sujeto a un control hormonal por parte del glucagon; además se ha encontrado que el tratamiento agudo con glucagon estimula la síntesis de citrulina en mitocondrias de hígado de rata, a partir de amoniaco, bicarbonato y ornitina (88). Dicho efecto estimulante del glucagon sobre la gluconeogénesis y la ureogénesis es debido a un aumento en el contenido de AMPc en las células hepáticas (89), y se acompaña dicho efecto de un aumento en la proporción ATP/ADP intramitocondrial relacionado con la mayor síntesis de citrulina (88).

EFFECTOS DE LA DIETA PROTEICA EN LA BIOSINTESIS DE LA UREA.

Schimke (72,90,91), encontró en la rata que el contenido total de las enzimas responsables en la biosíntesis de la urea

umentan coordinadamente al aumentar la ingesta protéica en la dieta; concluyó en su trabajo que " todas las condiciones estudiadas dan lugar a la degradación de proteínas y como consecuencia a un aumento en la excreción de la urea, no importando si se trata de una dieta rica en proteínas, ayuno o administración de corticoesteroides, todo lo cual está asociado con aumentos en las cinco enzimas del ciclo de la urea ". Se ha reportado además esta forma de adaptación en primates, incluyendo al hombre (92).

Por otro lado, se sabe que el efecto de la ingesta protéica sobre todas las enzimas del ciclo de la urea se manifiesta en dos formas: a largo plazo (días), mecanismo por medio del cual se requiere síntesis de proteínas, y a corto plazo (minutos a horas), en donde la enzima CPS I, la cual es dependiente del NAG, su activador alostérico, es influida por los niveles intramitocondriales de este compuesto. Además, Tatibana y col. (61,93) han demostrado que mediante la administración de una dieta rica en proteínas, se elevan los niveles de NAG en el hígado, así como del aminoácido L-arginina, el cual es un efector positivo de la N-acetil glutamato sintetasa (15); por otro lado, también aumenta el L-glutamato, el cual es sustrato de la N-acetil glutamato sintetasa.

SINTESIS Y DEGRADACION DE LA CPS I Y LA OTC.

Los niveles intramitocondriales de CPS I y OTC dependen del grado de síntesis y degradación de estas enzimas. Nicolletti y col. (94), al utilizar la técnica de doble marcaje con isótopos, calcularon la vida media de la CPS I en ratas, que fue del orden

de 7.7 días, cuando se administraba una dieta normal; 3.3 días con una dieta alta de proteínas; 4.6 días con una dieta libre de proteínas y 8.7 días en animales tiroidectomizados. Los estudios realizados con preparaciones de hígado de Rana catesbeiana, indicaron una vida media de 3.5 días para la CPS I, la cual se acorta a 2.3 días mediante un tratamiento con tiroxina (81). En el sistema del anfibio, la OTC tuvo una vida media de 4.0 días (citado en 51). No se conocen los factores que regulan la degradación de estas enzimas intramitocondriales.

ASPECTOS GENETICOS DEL CICLO DE LA UREA.

Con el desarrollo de técnicas de traducción de RNAm en sistemas libres de células, ha sido posible estudiar algunos de los factores relacionados con la regulación de la síntesis de RNAm, así como los eventos que operan en la traducción, el transporte y el procesamiento de los polipéptidos sintetizados para pasar a las formas maduras presentes en la mitocondria, como es el caso de la CPS I y la OTC, que son sintetizadas en el citoplasma y deben ser transportadas y procesadas a sus formas maduras que se encuentran en la mitocondria.

Experimentos realizados con RNAm para CPS I en hígado de rata (95,96), indican que su producto de traducción es más grande en 5000 daltones, que la forma madura presente en la mitocondria. El procesamiento de este precursor de la CPS I es por proteólisis en la membrana mitocondrial (96); por otro lado, también ha sido estudiada la traducción del RNAm de la OTC (97,98) y se ha observado la presencia de un precursor de 4000 daltones que funciona como un " péptido señal " que debe atravesar la membrana

intramitocondrial para convertirse en la forma madura de la enzima, mediante la acción de una proteasa presente en la matriz mitocondrial de hígado de rata (99).

Incidentalmente, es de interés señalar la existencia de una tercera carbamil fosfato sintetasa, llamada CPS III, la cual requiere de glutamina y acetil glutamato (100); esta enzima es activa en hígado de algunas especies de peces, los cuales retienen altas concentraciones de urea, que interviene en la regulación de su ósmosis.

ENZIMAS EXTRAMITOCONDRIALES EN LA BIOSINTESIS DE LA UREA.

A) ARGININOSUCCINATO SINTETASA.

La argininosuccinato sintetasa cataliza la reacción reversible de condensación entre la citrulina y el aspartato, utilizando un mol de ATP (101). Está presente en el hígado de animales ureotélicos, así como en pequeñas cantidades en riñón y en otros tejidos.

Esta reacción es fuertemente dependiente del pH: el pH óptimo para la síntesis de argininosuccinato es de 8.7 en presencia de una pirofosfatasa; mientras que la reacción en su forma reversible tiene un pH óptimo de 6.0 (102). Debido a que la existencia de pirofosfatasas es abundante en muchos tejidos, se acepta que la reacción de síntesis del argininosuccinato requiere la hidrólisis de dos enlaces de pirofosfato, es decir, -15.4 kcal/mol. Por otro lado, los requerimientos estructurales y estéricos para la unión del sustrato con la enzima se han analizado, comparando los grados de afinidad con diferentes análogos del aspartato. Los análogos han sido seleccionados con

respecto de su configuración, tanto alfa como beta (103-104). Los isómeros de la serie D son inactivos como sustratos de la enzima, además de que tienen baja afinidad y actúan como inhibidores. Cuando se sustituye por un metilo el hidrógeno de la posición alfa del aspartato, no se lleva a cabo la catálisis por la enzima, pero esto no interfiere la unión de la enzima, sin embargo, este compuesto actúa como inhibidor. Cuando se sustituye la posición beta del aspartato por un metilo o por un oxhidrilo, no se interfiere con la actividad de la enzima, sólo si estos grupos están en la configuración treo, porque cuando se les utiliza en la configuración eritro, estos compuestos funcionan como inhibidores (104), así, el treo-beta-metil-L-aspartato y el treo-beta-hidroxi-DL-aspartato, actúan como sustratos al igual que el L-aspartato.

El mecanismo de reacción para la condensación de la citrulina con el aspartato, implica que el grupo ureido de la citrulina es activado por ATP. Cuando la L-(ureido-18O)-citrulina es usada como sustrato, el oxígeno 18 es transferido al grupo fosfato del AMO (105). La forma activada de la citrulina es el complejo citrulina-adenilato. Por otro lado, se manifiesta inhibición por producto, por ejemplo, el AMP es inhibidor competitivo con respecto al ATP; el argininosuccinato es inhibidor competitivo con respecto a la citrulina, el ATP y el aspartato. Los datos cinéticos de las interacciones enzima-sustrato muestran, en una gráfica de dobles recíprocas, una cooperatividad negativa, que solamente se encuentra cuando el aspartato está a muy bajas concentraciones y en presencia del ATP. Bajo otras condiciones experimentales, las gráficas son

lineales. Se han postulado dos sitios catalíticos de la enzima, la cual está compuesta por cuatro subunidades de 45,000 daltones cada una, obtenidas en presencia de agentes reductores. Se deduce que la enzima es un tetrámero compuesto por dos dímeros, unidos por medio de enlaces disulfuro entrecruzados (citado en 106).

B) ARGININOSUCCINASA.

Esta enzima del ciclo de la urea originalmente fue encontrada junto con la argininosuccinato sintetasa (107) en la fracción soluble de hígado de mamíferos, aunque también se le ha encontrado en el riñón de varias especies de mamíferos. Cataliza la reacción reversible entre el argininosuccinato para dar como productos arginina y fumarato (108,109).

La afinidad del argininosuccinato por la enzima está influida por la naturaleza del amortiguador, así como por la fuerza iónica del medio, lo que originó una cinética de cooperatividad negativa entre el sustrato y la enzima. La argininosuccinasa es un tetrámero de 202,000 daltones, compuesta por cuatro subunidades de igual PM. El extremo amino del aminoácido terminal está bloqueado por un grupo acilo. En el sitio catalítico de la enzima existen cuatro grupos -SH, que intervienen durante la reacción; mediante un tratamiento suave con el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), a cero grados centígrados, aparecen ocho grupos -SH, debido a la formación del dímero correspondiente y si se continúa la disociación en las mismas condiciones, aparecen otros ocho grupos -SH que corresponden a la formación de subunidades monoméricas (citado en 106).

La argininosuccinasa de riñón de bovino tiene la capacidad de convertir citrulina en arginina; es de igual PM y estructura oligomérica que la de hígado, además de poseer los mismos nueve aminoácidos ácidos. Las principales diferencias se obtienen mediante exámenes inmunológicos, es decir, su capacidad catalítica es inhibida por el anticuerpo correspondiente. Por toda esta serie de similitudes se establece que ambas enzimas están codificadas por el mismo gene estructural.

La presencia de la argininosuccinasa en cerebro indica la capacidad de convertir citrulina en arginina, lo cual es de un gran significado en el metabolismo del cerebro. Se han observado valores elevados de argininosuccinato en el líquido cerebrospinal de pacientes con argininosuccinaturia, los cuales son deficientes en la argininosuccinasa (110).

C) ARGINASA.

El catabolismo de la arginina en organismos procariontes incluye su hidrólisis mediante la arginasa (L-arginina-urea hidrolasa E.C. 3.5.3.1.) para formar urea y ornitina. Se ha encontrado actividad de arginasa en microorganismos, como Bacillus subtilis (22), en eucariontes primitivos como Saccharomyces cerevisiae (29).

La presencia de arginasa en plantas sugiere que la L-arginina es usada como una reserva de nitrógeno, el cual puede ser usado para la síntesis de otros aminoácidos durante el desarrollo de la raíz. Se creea que la arginasa es inactiva durante el desarrollo, activándose durante la germinación (112).

En la metamorfosis de la Rana catesbeiana, la cual puede ser inducida mediante la adición de tiroxina, se obtiene una respuesta sincronizada de la aparición de las enzimas del ciclo de la urea, incluida la arginasa, que en este organismo se activa en presencia de manganeso (82).

En hepatocitos aislados de fetos de ratas con 16.5 días de edad, la actividad de la arginasa puede ser inducida en un medio de cultivo libre de hormonas por adición de glucocorticoides o de glucagon. La adición de las dos hormonas, induce la aparición de valores mayores de actividad de la arginasa de los que se observan al ser añadidos en forma individual. Esto sugiere que los receptores a glucagon y a glucocorticoides, aparecen en forma temprana, antes del nacimiento (113). Por otro lado, en pacientes humanos se han descrito cuadros clínicos de hiperargininemia (114 a 116), debido a la deficiencia de actividad de la arginasa o su carencia total. Dichos pacientes se caracterizan por tener retraso mental y severos trastornos nerviosos (117). En ratas con hiperargininemia, la administración de eritrocitos cargados con arginasa y se ha podido revertir el cuadro anómalo hasta por cinco días (118). Por otro lado, también se ha podido demostrar la existencia de dos genes que codifican para la arginasa en mamíferos (119), de los cuales, el producto de uno de los genes, el llamado AI, constituye el 98% y está presente en hígado y eritrocitos; el resto de la arginasa se encuentra en riñón, cerebro y tracto gastrointestinal y es codificada por el gene AII.

INTRODUCCION.

Después del descubrimiento del ciclo de la urea por Krebs y Henseleit en 1932, se hicieron considerables esfuerzos para estudiar las reacciones y sus intermediarios, pero la regulación del ciclo de la urea, en la actualidad, es insuficientemente conocida.

Se descubrió el papel del N-acetilglutamato como un efector alostérico de la carbamil fosfato sintetasa I, enzima que se encuentra localizada en la mitocondria. Además, se ha encontrado que la arginina es activador alostérico de la N-acetilglutamato sintetasa. Por otro lado, el efecto de las hormonas como el glucagon y la tiroxina, demostró que en todas las condiciones ensayadas aumentó la excreción de urea y por lo tanto, la actividad de las enzimas del ciclo de la urea.

Otra molécula importante es la ornitina que, a más de ser sustrato del ciclo, tiene relación con el control de la velocidad del mismo; la ornitina se produce en el citoplasma mediante la reacción de hidrólisis de la arginina y se debe transportar hacia la mitocondria, donde participa en la formación de la citrulina.

En este marco diverso de factores metabólicos que influyen en la regulación del ciclo de la urea, se presenta con detalle en esta tesis la influencia que tienen las hormonas glucagon y cortisol sobre ciertas funciones mitocondriales (síntesis de citrulina, fosforilación y respiración mitocondrial) en mitocondrias de hígado obtenidas en diferentes medios de aislamiento.

Dado que la ornitina se transporta hacia la mitocondria como alimentador del ciclo de la urea, también se revisa en esta tesis el efecto del calcio y la L-arginina sobre el transporte de la ornitina hacia la matriz mitocondrial.

Por último, se presentan evidencias que demuestran la participación directa del aminoácido D-arginina sobre la síntesis de la urea en hepatocitos y sobre la síntesis de la citrulina en mitocondrias de hígado de rata.

Se discuten los resultados en función de la regulación integral de la síntesis de urea en los mamíferos.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratas macho Wistar, con un peso de 200 a 250 g, alimentadas ad libitum. Los animales se sacrificaron por decapitación con tijeras y se obtuvieron las mitocondrias de hígado de acuerdo al método descrito por Schneider y Hogaboorn (120). En algunos experimentos, de acuerdo con Siess (121), se sustituyó a la sacarosa, empleada en el método original, por el manitol (0.3 M). Se empleó el siguiente medio de aislamiento: manitol 0.3 M, o sacarosa 0.3 M, EDTA (ácido etilen diamino tetraacético) 1 mM, TES (ácido N-tris(Hidroximetil)hidroximetil 1-2 aminometanosulfónico) 5 mM, ajustado a pH 7.3 con hidróxido de sodio 5 N.

La proteína mitocondrial fue determinada por medio de la reacción de biuret (122), utilizando albúmina sérica bovina como estándar y la adición de KCN para corregir por turbidez (123).

CONSUMO DE OXIGENO.

El consumo de oxígeno fue medido por medio de un electrodo para oxígeno (Yellow Spring Inst. Co.). El medio de respiración contenía succinato o glutamato-malato 10 mM como sustratos oxidables. Además, 3.3 mM de fosfato-tris pH 7.4, 2.6 mM MgCl₂, 3.3 mM KCl, 260 mM de manitol, 4.3 mM TES, 0.87 mM EDTA, en un volumen final de 3.0 ml a pH 7.3 y 22 °C, en una cámara cerrada. La respiración mitocondrial y la relación ADP:O fueron calculadas de acuerdo con Estabrook (124).

SINTESIS DE CITRULINA.

La síntesis de citrulina se determinó en el medio de

incubación descrito por Corvera y García-Sáinz (125), el cual contenía: 75 mM de tris-HCl, 5 mM KH₂PO₄, 15 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 16 mM KHCO₃, 1 mM EDTA, 10 mM ornitina, 10 mM succinato, 4 ug de rotenona, 25 mM de manitol, derivado de la suspensión mitocondrial y 10 mM de NH₄Cl, de 4 a 5 mg de proteína mitocondrial en 2.0 ml de volumen final, a pH 7.4. La cantidad de citrulina sintetizada se determinó por medio de la técnica espectrofotométrica descrita por Boyde y Rahmatullah (126).

REACTIVOS.

Se utilizaron reactivos de máxima pureza, obtenidos de Merck de México (sacarosa, EDTA, cloruro de amonio, cloruro de magnesio, fosfato monobásico de potasio, cloruro férrico, cloruro de potasio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, cianuro de potasio), de Baker de México (ácido clorhídrico, ácido perclórico, manitol, ácido sulfúrico), o de Sigma, St. Louis, MO (ácido glutámico, ácido succínico, manitol, EDTA, EGTA, TES, Tris, diacetil monoxima, L-arginina, L-ornitina, L-citrulina).

La administración de las hormonas fue por vía intraperitoneal. Se inyectó glucagon (90 ug x kg de peso), disuelto en solución salina (0.9%) 60 minutos antes de sacrificar al animal. El cortisol (50 mg x kg de peso) se inyectó 2 horas antes de sacrificar al animal.

RESULTADOS.

Desde hace 40 años se han utilizado indistintamente la sacarosa (127) y el manitol (128) para el aislamiento de mitocondrias del hígado de la rata. En 1983 Siess (121) estudió con detalle la influencia del medio de aislamiento para obtener mitocondrias de hígado de rata sobre ciertas funciones mitocondriales como la respiración en estado 3 y las actividades enzimáticas de la ATPasa, la piruvato carboxilasa, la succinato deshidrogenasa y la síntesis de citrulina. Este autor encontró que los resultados cuantitativos son diferentes cuando se utiliza manitol o sacarosa en el medio de aislamiento de las mitocondrias.

Por lo tanto, en nuestro laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Fac. de Medicina, para obtener una suspensión mitocondrial en condiciones óptimas, decidimos estudiar el efecto de la sacarosa y el manitol sobre las siguientes funciones mitocondriales: respiración, fosforilación y la síntesis de citrulina.

El control respiratorio de mitocondrias de hígado de rata, obtenidas en presencia de sacarosa o manitol como medios de aislamiento, fue medido utilizando succinato como sustrato (Tabla I). Los resultados obtenidos muestran un incremento del 22% en el control respiratorio de mitocondrias aisladas en manitol con respecto de las obtenidas en sacarosa; además existe evidencia experimental (129) de que las mitocondrias aisladas en sacarosa mostraron disminución tanto en algunas actividades enzimáticas (succinato deshidrogenasa, piruvato carboxilasa y ATPasa), como

en el control respiratorio, mientras que cuando se obtuvieron las mitocondrias en presencia de manitol como medio de aislamiento, se incrementaron los valores de las funciones mitocondriales analizadas. No existen diferencias significativas en el grado de fosforilación de las mitocondrias de hígado de rata (Tabla I), obtenidas en sacarosa o en manitol como medios de aislamiento.

Tabla I: EFECTO DEL MEDIO DE AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA SOBRE LA RESPIRACION Y FOSFORILACION CON SUCCINATO COMO SUSTRATO.

	CONTROL RESPIRATORIO		ADP:O	
Sacarosa	3.95 ± 0.17 (4)	100%	1.50 ± 0.09 (4)	100%
Manitol	4.80 ± 0.50 (3)	122%	1.65 ± 0.13 (3)	110%

Mitocondrias de hígado de rata (2 mg de proteína) se añadieron a una mezcla de incubación con 260 mM de manitol, 4.3 mM de TES, 0.87 mM de EDTA, pH 7.4; además el medio contenía 3.3 mM de fosfato-tris, pH 7.4, 2.6 mM MgCl₂, 3.3 mM KCl y 6.6 mM de succinato-tris, pH 7.4 como sustrato, en un volumen final de 3.0 ml a 22°C. La respiración se estimuló con 410 nmoles de ADP (estado 3). El número de animales entre paréntesis. Otras condiciones como en Material y Métodos.

Por otro lado, los resultados obtenidos para la síntesis de citrulina (Tabla II), no tienen diferencias significativas, con respecto al medio de aislamiento de las partículas mitocondriales; estos resultados son similares a los obtenidos por Siess (121); sin embargo, existe un incremento de hasta 3 veces en la producción de citrulina cuando la suspensión de mitocondrias se somete a una vigorosa agitación durante el tiempo

de la incubación (10 min), en comparación con las mitocondrias con el mismo medio de incubación para la síntesis de citrulina, pero sin agitar.

Tabla II: EFECTO DEL MEDIO DE AISLAMIENTO SOBRE LA CITRULINOGENESIS.

(nmolas x mg prot⁻¹ x 10 min⁻¹).

Medio de aislamiento	Sin agitación		Con agitación	
Sacarosa	72 ± 8.0 (3)	100%	205 ± 75 (3)	100%
Manitol	66 ± 2.0 (3)	92%	230 ± 58 (3)	112%

La síntesis de citrulina se midió en 2.0 ml de volumen final de un medio de incubación, que contenía: 4.5 mg de proteína mitocondrial, 75 mM de tris-HCl, 5 mM KH₂PO₄, 15 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 16 mM KHCO₃, 1 mM EDTA, 10 mM de succinato, 10 mM de ornitina y 4 µg de rotenona. Otras condiciones como en Materiales y Métodos. (\bar{x} ± SEM, con el número de animales indicados entre paréntesis).

Los resultados obtenidos con la agitación de las mitocondrias son de mucha importancia, debido a la influencia que ejerce la presencia del oxígeno (aunque no se ha cuantificado) en el medio de incubación para la síntesis de citrulina, hecho que se ha demostrado por Dodgson y col. (130) en el conejillo de Indias y cuyos resultados involucran la participación de la anhidrasa carbónica mitocondrial en la síntesis de citrulina, a partir de ornitina, amoníaco y bicarbonato. La presencia de la anhidrasa carbónica, también se ha demostrado en el interior de mitocondrias de tejidos de mamíferos (131). Bajo estas

condiciones de agitación vigorosa, los valores obtenidos, aunque más elevados, no reflejan diferencias con respecto del medio que se utilizó para el aislamiento de las mitocondrias.

De acuerdo con lo reportado por Siess (121), estos resultados indican que el manitol en el medio de aislamiento de mitocondrias las mantiene con una mejor integridad que el que se observa cuando se utiliza sacarosa. Esto puede deberse a efectos inhibitorios de la sacarosa (121).

Estudios de los efectos del glucagon y el cortisol sobre el metabolismo hepático en mamíferos muestran que estimulan la gluconeogénesis (83-85) y la ureogénesis mediante un aumento en el nivel de AMPc (89). El tratamiento agudo con glucagon estimula la síntesis de citrulina en mitocondrias aisladas de hígado de rata, a partir de amoniaco, ornitina y bicarbonato (88).

Se procedió a estudiar el efecto que tiene el glucagon sobre algunas funciones mitocondriales usando como medio de aislamiento manitol o sacarosa (Tabla III).

El efecto del glucagon sobre el control respiratorio con succinato como sustrato oxidable de las mitocondrias de hígado de rata obtenidas en sacarosa o en manitol, mostraron una ligera tendencia de aumento del 27% en las mitocondrias aisladas en manitol, con respecto de las mitocondrias aisladas en sacarosa.

En las mitocondrias de hígado de rata aisladas en presencia de sacarosa como medio de aislamiento y además suplementado con KCl, KH₂PO₄ y MgCl₂ (132), se obtuvieron valores mayores en la respiración y en la fosforilación mitocondriales, aunque se concluye que se requiere la presencia tanto del fosfato como del potasio para observar este efecto.

Tabla III: EFECTO DEL GLUCAGON SOBRE LA RESPIRACION Y FOSFORILACION DE MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA.

Medio de incubación	Control respiratorio con succinato como sustrato	ADP:O
Sacarosa	4.13 ± 0.6 100% (4)	1.48 ± 0.11 100% (4)
Manitol	5.25 ± 0.6 127% (3)	1.58 ± 0.08 107% (3)

La respiración y la fosforilación de las mitocondrias, se realizó como se describe en la Tabla I. Otras condiciones como en *Materiales y Métodos*. El glucagon se administró por vía intraperitoneal (90 ug x kg de peso) 30 minutos antes de sacrificar al animal. ($\bar{x} \pm SEM$, con el número de animales indicado en el paréntesis).

Por otro lado, al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Friedman y col. (133), que utilizaron mitocondrias de corazón de rata, el control respiratorio con succinato como sustrato, es menor que el obtenido por nosotros en 54%; sin embargo, en nuestros resultados no se encuentran diferencias significativas en el grado de fosforilación cuando se comparan los resultados obtenidos de las ratas tratadas con glucagon con respecto del azúcar utilizado en el medio de aislamiento.

Aunque se demostró el efecto estimulante del glucagon de aumentar ciertas funciones mitocondriales (Tabla IV), no se registró ninguna diferencia significativa con respecto del azúcar que se utilizó para el aislamiento de las mitocondrias. Así, la síntesis de citrulina se incrementa 80% después de la administración de glucagon cuando las mitocondrias se aislaron en

sacarosa y 100% cuando se aislaron en manitol, con respecto de los resultados obtenidos en ausencia de la hormona (Tabla II), pero no existen diferencias con respecto del medio de aislamiento utilizado, ya sea sacarosa o manitol. El mismo efecto se observó al incubar las mitocondrias y la mezcla de reacción con agitación vigorosa.

En resumen, el aumento en la síntesis de citrulina es por efecto de la administración de glucagon, pero no hay diferencias en el azúcar utilizado en el medio de aislamiento.

Tabla IV: EFECTO DEL GLUCAGON SOBRE LA SINTESIS DE CITRULINA EN MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA.

(nmolas x mg prot⁻¹ x 10 min⁻¹).

Medio de aislamiento	sin agitación		con agitación	
Sacarosa	135 ± 43	100%	277 ± 85	100%
Manitol	123 ± 38	91%	274 ± 55	99%

La incubación se realizó como se describe en Material y Métodos (125). La administración del glucagon fue por vía intraperitoneal (90 µg x kg peso) 30 minutos antes de sacrificar al animal.

(\bar{x} ± SEM, con 3 experimentos por dato).

El cortisol es otra hormona que también se ha estudiado en relación con la actividad de algunas enzimas del ciclo de la urea en el hígado de rata (134). Esta hormona ejerce un efecto anabólico en el hígado, mientras que en los tejidos periféricos se ha reportado que tiene un efecto catabólico (135). En vista de la estrecha relación de esta hormona con la síntesis de la urea, decidimos estudiar el efecto del cortisol sobre la respiración,

la fosforilación y la síntesis de citrulina en mitocondrias obtenidas en sacarosa o en manitol como medios de aislamiento.

Tabla V: EFECTO DEL CORTISOL SOBRE LA RESPIRACION Y FOSFORILACION MITOCONDRIALES.

	Control respiratorio (succinato)		ADP:O (succinato)	
	Control	Cortisol	Control	Cortisol
Sacarosa	3.49 ± 0.22 (8)	3.53 ± 0.2 (8)	1.53 ± .05 (8)	1.48 ± .06 (8)
	100%	100%	100%	100%
Manitol	4.64 ± 0.13 (7)	4.83 ± 0.23 (7)	1.56 ± .04 (7)	1.60 ± .04 (7)
	133%	137%	102%	108%

El cortisol fue administrado por vía intraperitoneal (50 mg x kg de peso). A las 2 horas se determinó la citrulina de acuerdo a la técnica descrita en Material y Métodos (126).
($\bar{x} \pm SEM$, con el número de animales entre paréntesis).

Cuando se utilizó succinato como sustrato, el control respiratorio de mitocondrias de hígado de rata aisladas en manitol fue superior en 33% (Tabla V) con respecto del valor obtenido en sacarosa.

Las mitocondrias de los animales que recibieron cortisol no manifestaron un cambio en el control respiratorio al ser incubadas con succinato; no obstante, dicho control respiratorio es 37% mayor en las mitocondrias preparadas con manitol en lugar de sacarosa (Tabla V).

La relación ADP:O no mostró cambios importantes respecto al azúcar utilizado para el aislamiento de la fracción mitocondrial, ni cuando se llevó a cabo el tratamiento con la hormona.

Tabla VI: EFECTO DEL CORTISOL SOBRE LA SINTESIS DE CITRULINA EN MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA.

	Sin agitación		Con agitación	
	Control	Cortisol	Control	Cortisol
Sacarosa	73 ± 10 (5)	123 ± 10 (4)	183 ± 38 (7)	292 ± 37 (5)
	100%	100%	100%	100%
Manitol	68 ± 19 (5)	147 ± 24 (4)	158 ± 38 (6)	262 ± 42 (5)
	93%	120%	83%	90%

Administración de cortisol (50 mg x kg de peso x 2 horas) por vía intraperitoneal. La determinación de citrulina se midió como está descrito en la Tabla II. ($\bar{x} \pm$ SEM, con el número de animales indicado entre paréntesis).

Los resultados presentados en la Tabla VI no mostraron ningún efecto sobre la citrulinogénesis en mitocondrias de hígado de rata, obtenidas en manitol o ensacarosa. Sin embargo, se obtuvo un incremento del 64%, en promedio, en la síntesis de citrulina, por el efecto del cortisol en ambos medios de aislamiento (manitol y sacarosa). Los valores obtenidos de síntesis de citrulina en agitación, son en promedio 2.5 veces mayores a los valores obtenidos sin agitación, aunque el efecto del cortisol en ambos casos (mitocondrias aisladas en manitol o en sacarosa), es el mismo; situación semejante a la observada cuando se administró glucagon. Estos resultados son similares a estudios previos (75,136), en los cuales se demostró una acción directa de los glucocorticoides en las enzimas del ciclo de la urea, la carbamil fosfato sintetasa I y la ornitina transcarbamilasa, las cuales

aumentan su actividad en ratas recién nacidas y adultas. Esta misma tendencia se observó cuando se utilizó el glucagon.

La obtención de mitocondrias de hígado de rata en manitol o en sacarosa permitió conocer la influencia que tiene el medio de aislamiento sobre algunas funciones mitocondriales. El manitol preservó en mejores condiciones la función de las mitocondrias, característica muy importante de los procesos metabólicos que requieren de la integridad de la membrana, como por ejemplo la cadena respiratoria.

Las mitocondrias de hígado de rata, contienen contaminantes de otras fracciones subcelulares, la presencia de la arginasa (137,138), enzima que cataliza la hidrólisis de la arginina en urea y ornitina, es de la mayor importancia en relación con la biosíntesis de citrulina por las propias mitocondrias. Los resultados que se presentan en la Tabla VII muestran la participación de la L-arginina en la síntesis de citrulina en un medio de incubación sin ornitina. La presencia de la arginasa como contaminante (137,138) en la preparación de mitocondrias se demostró debido a que en la mezcla de incubación se omitió la ornitina, uno de los sustratos para la formación de citrulina y sin embargo, sí se forma la citrulina.

La adición de ornitina a la mezcla de incubación, incrementó la formación de citrulina. Cuando se añadieron en forma conjunta la ornitina (10 mM) y la L-arginina (1.0 mM), junto con los demás sustratos requeridos, la síntesis de citrulina aumentó 265%, y hasta 470%, cuando se añadió L-arginina 10 mM (Tabla VII).

Tabla VII: EFECTO DE LA L-ARGININA SOBRE LA CITRULINOGENESIS
 EN MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA.
 (nmolas x mg de proteína⁻¹ x 10 min⁻¹)

L-arginina (mM)	Control	Ornitina (10 mM)
0	3.0 ± 1.0 (6)	174 ± 22 (6)
1.0	301 ± 25 (6)	461 ± 40 (6)
10.0	601 ± 45 (6)	817 ± 66 (6)

La síntesis de citrulina se realizó con mitocondrias en agitación como está descrito en la Tabla II. La reacción se paró con ácido perclórico (3% final) y la citrulina formada se midió de acuerdo como se describe en Materiales y Métodos (126). Otras condiciones como en Material y Métodos.

En ausencia de ornitina la síntesis de citrulina fue de 100 y 200 veces mayor al añadir arginina 1.0 y 10.0 mM respectivamente. Esta situación se ha descrito con anterioridad en varios reportes (14,137,139 a 141), pero con diferentes condiciones experimentales, en los que se ha hecho énfasis en la inhibición en el transporte de la ornitina por la arginina.

Se procedió, por medio de diversos tratamientos de lavado de una suspensión mitocondrial, a eliminar la presencia de la arginasa como contaminante, lo cual es un requisito indispensable para demostrar un posible efecto de la L-arginina sobre el transporte de la ornitina hacia la mitocondria. Uno de los tratamientos fue lavar la suspensión de mitocondrias con KCl 150 mM, con el objeto de que al cambiar la tonicidad del medio de

aislamiento, las proteínas extrínsecas, como puede ser el caso de la arginasa, se desprendieran de la membrana. Los resultados obtenidos muestran que persistió en promedio el 39% de actividad de la arginasa en las mitocondrias lavadas (Tabla VIII).

Tabla VIII:EFECTO DEL LAVADO CON KCl SOBRE LA CITRULINOGENESIS.

(nmolas x mg prot.-1 x 10 min -1).

L-arginina (mM)	Sin lavado	Lavado con KCl	% de actividad remanente de arginasa
0	3 ± 1.0 (4)	3 ± 2.0 (4)	0
0.1	64 ± 14 (4)	25 ± 8.0 (4)	38
1.0	288 ± 52 (4)	105 ± 39 (4)	36
10.0	555 ± 90 (4)	233 ± 74 (4)	41

Las mitocondrias obtenidas en forma tradicional, se sometieron a un lavado adicional en presencia de KCl 150 mM, se resuspendieron en el medio de aislamiento (manitol) y se ensayaron para la síntesis de citrulina en un medio con agitación vigorosa.
($\bar{x} \pm SEM$, con en número de animales entre paréntesis).

Se utilizaron dos tratamientos adicionales, en los cuales el objetivo principal fue eliminar la actividad de la arginasa como contaminante en la suspensión de mitocondrias.

La síntesis de citrulina en mitocondrias de hígado de rata en presencia de diferentes concentraciones de arginina (Tabla IX) como sustrato en sustitución de la ornitina, demostró la presencia de la actividad de la arginasa a las concentraciones de arginina ensayadas en la preparación mitocondrial;

Tabla IX: EFECTO DE DIVERSOS TRATAMIENTOS PARA LA ELIMINACION DE LA ARGINASA SOBRE LA CITRULINOGENESIS.

L-arginina (mM)	Control	Ficoll 20%	Norleucina 25 μ M	Ficoll y Norleucina.
0	14 \pm 0.5	7 \pm 2.0	7.0	0
0.01	26 \pm 4.0	17 \pm 1.0	10.0	1 \pm 1.0
0.10	54 \pm 10	35 \pm 0.5	37.0	7 \pm 5.0
1.0	257 \pm 80	191 \pm 20	148.0	71 \pm 11
10.0	747 \pm 115	393 \pm 33	274.0	175 \pm 34

La síntesis de citrulina se ensayó después de someter a la suspensión de mitocondrias al tratamiento de lavado o a la adición del inhibidor correspondiente. Otras condiciones, como en Materiales y Métodos.

($\bar{x} \pm$ SEM, con 3 experimentos por dato).

sin embargo, cuando la suspensión de partículas se sometió a un lavado con ficoll al 20%, la formación de citrulina en presencia de diferentes concentraciones de arginina disminuye en un 40% (Tabla IX). Por otro lado, cuando la síntesis de citrulina se ensayó en presencia del inhibidor de la arginasa, norleucina (Dr. Jaime Mora comunicación personal), la disminución en la formación de citrulina con respecto del control fue de aproximadamente un 50%.

La aplicación en forma conjunta de los dos tratamientos

(lavado con ficoll al 20% y adición de norleucina) sobre las mitocondrias obtenidas para ensayar síntesis de citrulina, disminuyó la producción de citrulina en un 87%. Por lo tanto, se eliminó en forma considerable la presencia de la actividad de la arginasa como contaminante en la preparación de mitocondrias de hígado de rata. De esta manera, se optimizaron las condiciones para observar el posible efecto de la arginina a bajas concentraciones sobre el transporte de ornitina, que es otro aspecto en la regulación del ciclo de la urea que se analizó (siguiente parte de la tesis).

TRANSPORTE DE ORNITINA EN MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA:
EFECTO DEL CALCIO Y LA ARGININA.

ALFREDO SAAVEDRA-MOLINA Y ENRIQUE PIRA.
DEPTO. DE BIOQUIMICA, FAC. DE MEDICINA, UNAM.
APDO. POSTAL 70159, MEXICO, D.F., 04510, MEXICO.

RESUMEN.

En este trabajo se estudia el efecto del calcio y la L-arginina sobre el transporte de ornitina por mitocondrias de hígado de rata. En ausencia de arginina, la presencia de los iones calcio a una concentración de 0.36 μM , aumenta la captación de ornitina en un 218% sobre el control, pero a concentraciones mayores de 1 μM del metal, la captación del aminoácido disminuye. Por otro lado, si se mantiene constante la concentración de calcio en el medio de incubación (0.36 μM), el transporte de ornitina se eleva en presencia de L-arginina 5 μM y luego disminuye a mayores concentraciones de arginina.

Se discute el posible papel del calcio y la arginina como reguladores fisiológicos del transporte de ornitina en mitocondrias de hígado de rata.

INTRODUCCION.

El transporte de la ornitina en mitocondrias de hígado de rata ocurre a través de la membrana interna mitocondrial como un paso intermedio que sucede en el ciclo de la urea. En la matriz mitocondrial la ornitina es carbamilada para formar L-citrulina, que a su vez sale de la mitocondria y es el sustrato de las reacciones extramitocondriales que van a producir urea, con la consiguiente regeneración de la ornitina (1,2).

Algunos estudios han demostrado que la ornitina, como catión, es introducida en las mitocondrias por medio de un transportador específico electrogénico de tipo uniporte (3), el cual no está necesariamente relacionado con el transporte de la citrulina (4).

Por otro lado, la translocación de la ornitina puede ser por medio de un sistema de intercambio de ornitina/protón (5), el cual está relacionado con el catabolismo de la ornitina por medio de la vía de transaminación del semialdehído- γ -glutámico. Sin embargo, también se ha propuesto el mecanismo de tipo antiporte ornitina/citrulina (6), el cual es específico para el funcionamiento del ciclo de la urea. Más recientemente Bryla y Neidzwiecka (7) sugirieron que el efecto estimulante del oleato sobre la síntesis de citrulina puede ser debido a un aumento en la captación de ornitina por las mitocondrias de hígado de rata; sin embargo, en otros reportes (8) se indica que en condiciones óptimas de formación de urea, la concentración de ornitina en el citoplasma contribuye de manera significativa en el control de la ureogénesis.

En este trabajo se estudia la influencia del calcio o la arginina, compuestos que influyen en el ciclo de la urea, sobre el transporte de ornitina a través de la membrana mitocondrial.

MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron ratas macho Wistar, con un peso de 200 a 250 g, alimentadas ad libitum. Los animales se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron las mitocondrias del hígado de acuerdo al método descrito por Schneider y Hogeboom (9). En algunos experimentos, se sustituyó a la sacarosa, empleada en el

método original, por el manitol (0.3 M), en vista de que se ha encontrado que el manitol mantiene una mejor integridad de las mitocondrias que la sacarosa (10). Por otro lado, en una serie de experimentos, las mitocondrias fueron centrifugadas en presencia de un gradiente de ficoll (11), con el objeto de eliminar la presencia de arginasa contaminante (12 a 14).

La captación de ornitina se midió en el medio de incubación descrito por Bradford y McGivan (6). El procedimiento específico fue el siguiente: 40 μ l de mitocondrias, de una suspensión que contenía 50 mg de proteína por mililitro (10) se preincubaron 3 min a 20 °C, en un medio con: manitol 50 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, fosfato de potasio 2 mM, rotenona 2 μ g, aminooxiacetato 0.5 mM y concentraciones variables de arginina mas DL-norleucina 25 μ M y concentraciones variables de CaCl₂ suplementadas con EGTA 1 mM, para mantener la concentración de calcio libre, de acuerdo al programa descrito por Fabiato y Fabiato (16). El pH fue ajustado a 7.40 y el volumen final fue 1.0 ml. Para iniciar la reacción se añadieron 15 μ l que contenían 8.89 nmoles de (1-¹⁴C)-L-ornitina (actividad específica 43 mCi/mmol) y la mezcla se incubó 30 seg a 20 °C. La reacción se terminó por filtración de la mezcla de reacción a través de una membrana Sartorius (tamaño del poro 0.45 μ m), la cual se lavó con 10 ml de ornitina 20 mM, no radiactiva. Los filtros se colocaron en líquido de centelleo elaborado a partir de tritón (17) y la radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido Packard, con una eficiencia del 54%.

La proteína mitocondrial se midió por medio de la reacción de Biuret (18) utilizando seroalbúmina bovina como estandar y KCN

para corregir por turbidez (19).

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma, a excepción de la (1-14C)L-ornitina (actividad específica 52.7 mCi/mmol), la cual se obtuvo de New England Co. USA.

RESULTADOS Y DISCUSION.

El efecto del calcio y la L-arginina sobre el transporte de la ornitina se midió en presencia de DL-norleucina, aminooxiacetato y rotenona para inhibir la actividad de arginasa contaminante, la ruta catabólica de la transaminación de la ornitina y la utilización de sustratos endógenos, respectivamente (12-15). El valor basal de captación de la ornitina fue 52 pmoles \times min/mg proteína, valor que además no cambia cuando las mitocondrias se encuentran respirando en presencia de succinato como sustrato. El transporte de ornitina se estimuló (Fig. 1), en forma dosis-respuesta, al aumentar la concentración del ión calcio entre 0.25 y 0.57 μ M, el máximo transporte de la ornitina se obtuvo con 0.36 μ M de CaCl₂, se logró hasta un 218% de aumento sobre el valor basal. Cuando se utilizaron concentraciones de calcio mayores de 0.57 μ M, la acumulación de ornitina disminuyó hasta el valor del control. Al sustituir el manitol por sacarosa en el medio de aislamiento de mitocondrias (Fig. 1), se obtuvo un efecto similar, (datos no mostrados) el máximo aumento en el transporte de la ornitina, 136%, se registró con 0.36 μ M de CaCl₂ (promedio de tres diferentes experimentos).

La regulación en el transporte de la ornitina por los iones de calcio, descrita en este trabajo, es de gran interés fisiológico debido a que justamente se detectó en el rango de

variación de la concentración de este catión dentro de la célula hepática; esto es, se ha reportado que la concentración de calcio en el citoplasma de células hepáticas es de 100 a 200 nM (20).

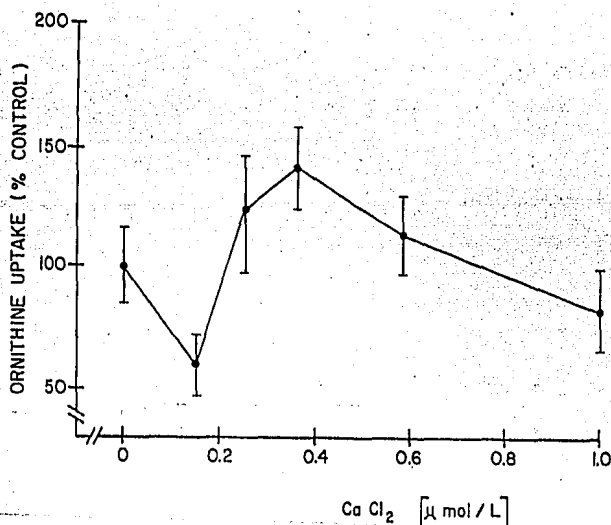


FIG. 1: Efecto del calcio sobre el transporte de ornitina.

El transporte de ornitina se midió con mitocondrias preparadas en manitol como medio de aislamiento. Los valores basales de la captación de ornitina fueron: 3900 \pm 500 cpm \times min / mg prot. Los resultados están representados como la media \pm error estandar de al menos 4 experimentos por separado y en duplicado.

Se ha demostrado la directa participación del calcio sobre la estimulación de la ureogénesis mediado por hormonas que movilizan calcio (21), así como la activación de las enzimas de la síntesis del N-acetil glutamato (22). Por lo tanto, estas posibilidades en forma combinada podrían ejercer un efecto en la activación del transporte de la ornitina *in vivo*.

Por otro lado, se mencionan otras funciones mitocondriales como la fosforilación oxidativa de mitocondrias de músculo esquelético (23) y de mitocondrias de corazón (24), que resultan afectadas por altas concentraciones endógenas de calcio, lo cual sugiere que esta acumulación de calcio (10 nmoles/mg prot) puede afectar directamente la actividad de las enzimas intramitocondriales responsables de la transducción de la energía.

En las condiciones experimentales descritas en la figura 1 al elevar las concentraciones de CaCl_2 a 1 μM disminuye el transporte de ornitina hasta los valores del basal, lo cual es opuesto al reporte de Gamble y Lehninger (3), quienes encontraron que concentraciones de calcio inhiben el transporte de la ornitina en mitocondrias de hígado de rata debido a una inhibición en la generación de la energía por el transporte de electrones. Sin embargo, existen diferencias en el diseño de los experimentos descritos en este trabajo y los reportados por Gamble y Lehninger (3), las cuales podrían ser la causa de los resultados contradictorios recién descritos.

Los resultados presentados en la figura 2 nos muestran el efecto de la L-arginine sobre el transporte de ornitina. Bajas concentraciones de L-arginina, 5 μM , estimula la acumulación de ornitina intramitocondrial (188%). Estos resultados también son diferentes a los obtenidos tanto por Gamble y Lehninger (3), como por Hommes y col. (15) quienes a concentraciones de arginina entre 1.0 y 3.75 mM demostraron una inhibición en el transporte de ornitina.

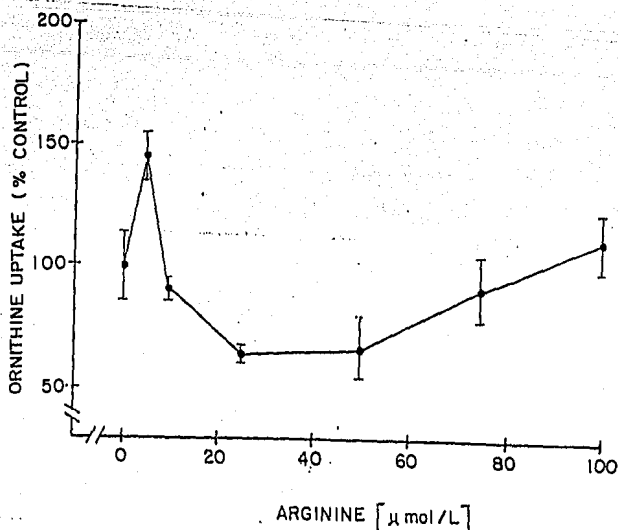


FIG.2: Efecto de la arginina sobre el transporte de la ornitina.

La captación de la ornitina se midió como está descrito en Material y Métodos. El valor basal de la captación de ornitina fue 2700 ± 200 cpm \times min / mg proteína. Los resultados son la media \pm el error estándar de por lo menos 4 experimentos separados y en duplicado.

Los datos de la figura 2 indican que a concentraciones de arginina por arriba de 25 μ M se inhibe la captación de ornitina.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Ratner, S. (1973) Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol. 39: 1-90.
- 2.- Tatibana, M., Shigesada, K. y Mori, M. (1976) en: The Urea Cycle. (Grisolia, S., Mayor, F. y Baguena, R., eds.) Wiley Sons, N.Y., pag. 95-105.
- 3.- Gamble, J.G. y Lehninger, A.L. (1973) J. Biol. Chem. 248: 610-618.
- 4.- Bryla, J. y Harris, E. J. (1976) FEBS Lett. 72-2: 331-336.
- 5.- McGivan, J.D., Bradford, N.M. y Beavis, A.D. (1977) Biochem. J., 162: 147-156.
- 6.- Bradford, N.M. y McGivan, J.D. (1980) FEBS Lett. 133: 274-298.

- 7.- Bryla, J. y Neidzwiecka, A. (1983) *Int. J. Biochem.* 15: 1187-1189.
- 8.- Metoki, K. y Hommes, F.A. (1984) *Int. J. Biochem.* 16: 1155-1157.
- 9.- Schneider, W.C. y Hogeboom, G.H. (1950) *J. Biol. Chem.* 183: 123-128.
- 10.- Siess, E.A. (1983) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364: 279-290.
- 11.- Moore, C. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 138: 295-305.
- 12.- Mora, J., Martuscelli, J., Ortiz-Pineda, J. y Soberón, G. (1965) *Biochem. J.* 96: 28-35.
- 13.- Soberón, G. y Palacios, R. (1976) en: *The Urea Cycle* (S. Grisolia, F. Mayor y Baguena, R. eds.) Wiley Sons, NY, 221-235.
- 14.- Freedland, R.A., Crozier, G.L., Hicks, B.L. y Meijer, A.J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 802: 407-412.
- 15.- Hommes, F.A., Kitchings, L. y Eller, A.G. (1983) *Biochem. Med.* 30: 313-321.
- 16.- Fabiato, A. y Fabiato, F. (1979) *J. Physiol. Paris* 75: 463-505.
- 17.- Fricke, Y. (1975) *Anal. Biochem.* 63: 555-558.
- 18.- Cleland, K.W. y Slater, E.C. (1953) *Biochem. J.* 53: 547-556.
- 19.- Keyser, J.W. y Vaughn, J. (1949) *Biochem. J.* 44: 22-23.
- 20.- Murphy, E., Coll, K., Rich, T.L. y Williamson, J.R. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 6600-6608.
- 21.- Corvera, S. y García-Sáinz, J.A. (1982) *Life Sci.* 31: 2493-2498.
- 22.- Shigesada, K. y Tatibana, M. (1978) *Eur. J. Biochem.* 84: 285-291.
- 21.- Vallieres, J., Scarpa, A. y Somlyo, A.P. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 170: 659-669.
- 23.- Moreno-Sánchez, R. (1983) *Biochem. Biophys. Acta* 724: 278-285.
- 24.- Kroom, A.M. (1966) en: *The Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E. y Slater, E.C. eds.) vol. 7, pag. 397-414, BBA Library, Elsevier Amsterdam.

EFFECTO DE LA D-ARGININA EN HIGADO DE RATA.

Alfredo Saavedra-Molina y Enrique Piña.
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.N.A.M.
Apartado postal 70159, México, D.F., 04510, MEXICO.

Los isómeros L de los aminoácidos son los más abundantes en la naturaleza, los que constituyen todas las proteínas de los seres vivos y los que pueden ser fácilmente desaminados e incorporados al metabolismo celular.

Los D-aminoácidos son menos abundantes en la naturaleza, no se incorporan a las proteínas aunque se incorporan en algunos péptidos pequeños en las bacterias, los hongos y ocasionalmente los insectos, y su destino metabólico es el ser desaminados, para, en forma de los correspondientes cetoácidos, ser aprovechados por la maquinaria metabólica celular. Se han identificado dos tipos generales de reacciones celulares que dan por resultado la desaminación de aminoácidos, tanto de la configuración L como la D: las reacciones de transaminación y las reacciones de desaminación oxidativa.

En los mamíferos, el metabolismo de los L-aminoácidos se realiza preferentemente en el hígado, mientras que el metabolismo de los D-aminoácidos parece ser una función más relacionada con el riñón que con el hígado (1).

El estudio de las reacciones de transaminación se ha realizado primordialmente con los L-aminoácidos (2), mientras que los estudios de desaminación oxidativa pioneros (3), incluyen la desaminación de los L y D isómeros. Al ampliar las

investigaciones sobre las D-aminoácido oxidasas (D-AD) de mamíferos, se encontró que son las encargadas de catalizar la oxidación de D-aminoácidos ácidos y neutros, y no son activas sobre los L-aminoácidos, pero no se conoce el proceso biológico de la oxidación de D-aminoácidos básicos.

Se ha aislado del hígado, el riñón y cerebro de algunas especies de mamíferos (4 a 7), una D-AD (E.C.1.4.3.3.) que además de oxidar y desaminar los aminoácidos ácidos y neutros puede utilizar otros sustratos como la tiazolidina-2-ácido carboxílico, un intermediario entre el glioxilato y la cisteamina (8), además nitrometano (9) y algunos D-hidroxiácidos—(10,11), los cuales están muy lejos de ser considerados de importancia biológica.

Se ha identificado además una D-aspartato oxidasa (E.C.1.4.3.1.), la cual muestra especificidad sobre la forma D del ácido aspártico (12), que ha sido detectado en hidrolizados de proteínas envejecidas en dientes (14) y en el cristalino del ojo (15), así como en preparaciones de eritrocitos (16 a 18), en donde la forma L del ácido aspártico racemiza a la forma menos común, con configuración D, se desconoce el papel funcional de estas modificaciones. Se ha sugerido (4,12) que en hígado, la D-aminoácido oxidasa pueda desaminar los D-aminoácidos provenientes de bacterias, hongos e insectos que crucen la barrera intestinal. Otra alternativa (5), describe su desempeño en la regulación del balance ácido-base, debido a que en el riñón de organismos superiores se producen grandes cantidades de amoniaco como uno de los productos de la desaminación oxidativa. Por otro lado, Barker y col. (5) mencionan que las D-aminoácido oxidasas

en organismos superiores pueden representar reliquias de nuestra evolución.

Los estudios de las D-AD incluyen el análisis de las características cinéticas de la enzima (19), la formación de complejos estructurales (20,21) y hasta aspectos teóricos de modelos moleculares que deben tener él o los sustratos de la propia D-aminoácido oxidasa (22). A pesar de contar con toda esta información, no se ha podido definir la presencia de algún transportador a nivel de la membrana celular de mamífero, o en los organelos celulares, para cualquiera de los D-aminoácidos.

Toda la información disponible se ha orientado a investigar la desaminación de los D-aminoácidos en los tejidos de mamíferos para el manejo posterior de los cetoácidos formados. No parece existir información sobre el posible papel fisiológico de algunos de los D-aminoácidos, lo cual podría ser de enorme interés en la Biología en general.

Los estudios realizados en nuestro laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, estaban orientados al análisis de la captación de L-arginina por mitocondrias de hígado de rata. Ensayamos la posibilidad de que la D-arginina actuara como inhibidor competitivo del transporte de L-arginina y para nuestra sorpresa, la D-arginina fue activamente incorporada a las mitocondrias en estudio. Como consecuencia se decidió estudiar el posible papel fisiológico de la D-arginina en el hepatocito de nuestro animal experimental.

Los resultados que hemos obtenido, señalan una participación directa de la D-arginina en las diferentes vías metabólicas que se analizaron.

Materiales y Métodos.

Se aislaron mitocondrias de hígado de rata macho Wistar, con un peso entre 180 a 250 g, de acuerdo con Schneider y col. (23) y modificado por Siess (24). Se empleó el siguiente medio de aislamiento: manitol 300 mM, EDTA (ácido etilen diamino tetraacético) 1 mM, Tris 5 mM, pH 7.3. La proteína mitocondrial fue medida por medio de la reacción de Biuret, utilizando albúmina sérica bovina como estandar y la adición de KCN para corregir por turbidez (25).

Consumo de Oxígeno.

El consumo de oxígeno fue medido por medio de un electrodo para oxígeno (Yellow Spring Inst. Co.), en una mezcla de incubación con 3.0 ml. de volumen final. Se utilizó succinato o glutamato-malato 10 mM como sustratos, a pH 7.3 y a 22°C. La respiración mitocondrial y la relación ADP:O fueron calculadas de acuerdo con Estabrook (26).

Síntesis de Citrulina.

La citrulinogénesis se llevó a cabo en el medio de incubación descrito por Tatibana y col. (27) con ATP y suplementado con glutamato-acetato. La cantidad de citrulina sintetizada se determinó por medio de la técnica espectrofotométrica de Rahmatullah y col. (28).

Potencial de Membrana.

Se midió la generación del potencial de la membrana

mitocondrial utilizando safranina como indicador (29). Los cambios en la absorción dependientes del tiempo fueron registrados con un espectrofotómetro Aminco, a las longitudes de onda especificadas en las leyendas de las figuras.

Hinchamiento Osmótico.

El hinchamiento osmótico de las mitocondrias fue medido por el método descrito por Gamble y Lehninger en (30). Se registraron los cambios en el volumen mitocondrial como cambios en la absorbancia de la suspensión mitocondrial a 540 nm y 25 °C, en soluciones isoosmóticas (250 mosm/L) de varios solutos, suplementadas con 3 ug de rotenona, para suprimir la respiración endógena.

Aislamiento de Hepatocitos.

Los hepatocitos fueron aislados utilizando la técnica descrita por Berry y Friend (31), por medio de la cual se exponen al máximo los espacios intercelulares del hígado a la acción de la colagenasa, la cual degrada los elementos adhesivos presentes entre las células. A través de la vena porta se perfunde en forma continua, el medio de Krebs-Ringer-bicarbonato, equilibrado con 95% O₂/ 5% CO₂, a 37 °C, pH 7.4 y las células se resuspenden en medio fresco suplementado con albúmina al 1%.

Síntesis de Urea.

En tubos de plástico con el medio de incubación Krebs-Ringer-bicarbonato-albúmina, suplementado con ornitina 2 mM y cloruro de amonio 10 mM como sustratos ureogénicos, se agregaron alícuotas de la suspensión de hepatocitos, los tubos fueron incubados en un baño con agitación, a 37 °C, durante 60 min. La urea producida

fue cuantificada mediante la técnica descrita por Gutmann y Bergmeyer (32).

Resultados.

En la figura 1A se observa un cambio en absorbancia de la safranina debido a la inducción de un potencial de la membrana mitocondrial por iones H catalizado por succinato, dicho cambio, se suprime cuando se añade CCCP (carbonil, cianuro, m-clorofenil hidrazona), un desacoplante de la fosforilación oxidativa. Cuando la D-arginina (3.3 mM) se añade a las mitocondrias energizadas, se observa una despolarización de la membrana mitocondrial de hígado de rata (Fig. 1B). La despolarización va seguida de una repolarización lenta. Esto quiere decir que el transporte de la D-arginina a la manera del de calcio (33,34) necesita un potencial de membrana para entrar a la mitocondria. El grado de despolarización de la membrana mitocondrial es dependiente de la concentración de D-arginina y la máxima concentración utilizada fue 64 mM; la repolarización de la membrana, aunque se restablece en forma lenta, no logra obtener los niveles originales de energización (Fig. 1B).

Debido a que el aminoácido que se utiliza en forma natural es el isómero L y no el isómero D, decidimos estudiar el efecto de la L-arginina sobre el potencial de la membrana mitocondrial usando mitocondrias y mitoplastos. Los resultados obtenidos con mitocondrias (Fig. 2A) muestran que después de añadir L-arginina (16 mM) a diferentes tiempos, no se modifica el potencial de la membrana, sin embargo, cuando se añade D-arginina (16 mM), se presenta la despolarización. De la misma manera, cuando se utilizan mitoplastos para ensayar el transporte de L-arginina, no

ocurre despolarización de la membrana mitocondrial, hasta que se añade D-arginina (Fig. 2B), aunque se observan algunas diferencias cuando se comparan los resultados obtenidos con mitocondrias y con mitoplastos. Por ejemplo, en mitoplastos cuando se añade L-arginina, se hiperpolariza la membrana, mientras que en mitocondrias no ocurre ninguna modificación (datos no mostrados). Además, el grado de despolarización inducido por la D-arginina en membranas de mitocondrias es mayor que el inducido en las membranas de mitoplastos. Se utilizaron mitoplastos con el objeto de eliminar la presencia de la contaminación de arginasa, unida a la membrana externa de la mitocondria, lo cual ha sido descrito por algunos autores (35 a 37) y además, el diseño de este experimento fue con el objeto de demostrar la existencia de transporte electrogénico de la L-arginina, sin embargo, los resultados muestran que no existe entrada del L-isómero ni en mitocondrias ni en mitoplastos (datos no mostrados).

Existe una prueba adicional que nos permite demostrar el transporte de una sustancia; esta técnica es el hinchamiento osmótico mitocondrial. La sustancia que se pretende analizar para medir su transporte, se hace acompañar de un anión que es permeante a la membrana interna mitocondrial. La D-arginina tiene pH isoelectrico de 10.8, de manera de que se presenta como catión al pH 7.3. Para examinar los factores que afectan la entrada de D-arginina a pH 7.3, se prepararon mitocondrias de hígado de rata y se suspendieron en diferentes soluciones isoosmóticas de D-arginina (acetato, fosfato). Los resultados que se obtuvieron (Fig. 3a) demuestran hinchamiento mitocondrial

dependiente de succinato en forma significativa cuando se utilizó acetato de D-arginina o fosfato de D-arginina. En ausencia de succinato, el cambio en el hinchamiento mitocondrial no ocurre, de manera que el transporte de D-arginina requiere de la formación de un gradiente electroquímico. Cuando se añade cianuro como inhibidor o dinitrofenol como desacoplante de la respiración, se abate el hinchamiento mitocondrial.

Por medio de la utilización de la safranina como prueba del potencial de la membrana mitocondrial, así como por el hinchamiento osmótico mitocondrial hemos obtenido evidencia que confirma la existencia del transporte electrogénico de la D-arginina hacia el interior de la mitocondria.

Para tratar de encontrar un posible papel fisiológico de la D-arginina en alguna vía metabólica en la mitocondria, se decidió estudiar el efecto de este D-aminoácido sobre la síntesis de citrulina (intermediario del ciclo de la urea). Se seleccionó esta vía metabólica, dado que la L-arginina interviene activamente en la misma.

La carbamil fosfato sintetasa I (E.C. 6.3.4.16.) cataliza la síntesis del carbamil fosfato, el primer intermediario en la biosíntesis de la urea en hígado de animales ureotéticos, que al condensarse con la ornitina, origina la formación de la citrulina. La carbamil fosfato sintetasa I requiere de N-acetil glutamato como activador alostérico (38,39); a su vez, el aminoácido L-arginina estimula la síntesis de N-acetil glutamato (40). La L-arginina actúa como un efector positivo de la N-acetil glutamato sintetasa, de manera que la presencia del L-aminoácido incrementa la formación de citrulina en mitocondrias de hígado de

rata. Por tal motivo, decidimos investigar el efecto de la D-arginina, en lugar del L-aminoácido, sobre la síntesis de citrulina.

Los resultados obtenidos (Fig. 4a) demuestran que a los 5 min. de incubación hay aumentos en la formación de la citrulina, que van desde 45, 64 y 39% con 10, 20 y 40 μM de D-arginina ($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.05$) respectivamente. Por otro lado, a concentraciones mayores de D-arginina (100 μM), la citrulinogénesis regresa a los valores del control. A los 10 y 15 minutos de incubación (Fig. 4b, 4c), la síntesis de citrulina se incrementa 71 y 38% con 10 y 20 μM de D-arginina, respectivamente. La citrulinogénesis permanece aumentada (27%) a los 20 minutos (Fig. 4d) en presencia de 10 μM de D-arginina. Sin embargo, cuando se utilizan concentraciones mayores (100 μM) a los 10, 15 y 20 min. de incubación, la citrulinogénesis en presencia de D-arginina, se inhibe hasta un 60% (en promedio), de manera que el efecto estimulador que ejerce la D-arginina se obtiene a concentraciones que oscilan entre 10 a 40 μM del D-aminoácido. Por lo tanto, se ha demostrado primeramente que la membrana interna mitocondrial es permeable a la D-arginina y por otro lado, que ésta ejerce un efecto de estimulación sobre la síntesis de citrulina. En experimentos *in vivo* (41,42), se ha propuesto que la L-arginina contribuye a la regulación de la síntesis de la urea en hepatocitos de rata, por medio de la activación de la N-acetil glutamato sintetasa, aunque también se ha demostrado que dicho efecto sobre la sintetasa, no es el único punto de la regulación de la síntesis de la urea (37). Nosotros decidimos sustituir a la L-arginina por la D-arginina para

ensayar síntesis de urea en hepatocitos aislados de rata.

Los resultados obtenidos (Tabla I) nos demuestran que la ureogénesis se incrementa (46%) a los 30 min de incubación de los hepatocitos (viabilidad 80 a 95%) en presencia de sustratos ureogénicos (cloruro de amonio y ornitina) suplementados con D-arginina 200 μ M; al cabo de 60 min, el incremento en la ureogénesis es 36% con 200 μ M de D-arginina; a concentraciones altas (800 μ M), la síntesis de urea desciende por abajo del control. De igual manera que en la citrulinogénesis en mitocondrias, la ureogénesis en hepatocitos, resulta incrementada, debido a la presencia del D-aminoácido.

De manera adicional, se estudió el efecto de la D-arginina sobre la respiración mitocondrial en presencia de succinato o glutamato-malato como sustratos. Este proceso metabólico, el cual se encuentra acoplado con la fosforilación oxidativa, ambos se desarrollan en la membrana interna mitocondrial y tienen como función principal el proveer de energía a la célula. Los resultados obtenidos en la Tabla II demuestran que el control respiratorio en mitocondrias de hígado de rata, con succinato como sustrato, en presencia de 10 y 20 μ M de D-arginina se obtiene un incremento del 8 y 22%, respectivamente, mientras que con 100 μ M de D-arginina, se inhibe el control respiratorio con respecto del control. Cuando se utiliza glutamato-malato como sustrato de la respiración mitocondrial, se inhibe dicho proceso, inclusive con concentraciones bajas (10 a 20 μ M) de D-arginina. La fosforilación oxidativa (Tabla III) nos muestra un ligero incremento (9%) de este proceso, en presencia de concentraciones bajas de D-arginina (10-20 μ M), aunque estos resultados no son

Figura 1: Cambios espectrales en la safranina, inducidos por D-arginina.

Se suspendieron mitocondrias de hígado de rata (2 mg de proteína) en un volumen final de 3.0 ml conteniendo: sacarosa (70 mM), HEPES (2 mM), manitol (210 mM), rotenona (3 ug), acetato (3 mM) y safranina (9uM). La energización mitocondrial se obtuvo al añadir succinato (1.5 mM). Lado A: Adición de CCCP (2 uM). Lado B: Las concentraciones de D-arginina utilizadas fueron (en mM): a) 3.3, b) 8.0, c) 16, d) 32, e) 64.

Figura 2: Cambios espectrales en la safranina, inducidos por la D-arginina.

Lado A: mitocondrias de hígado (2 mg). Lado B) mitoplastos (2 mg) y la L-arginina (16 mM). Otras condiciones experimentales, como en la figura 1.

FIGURA 1

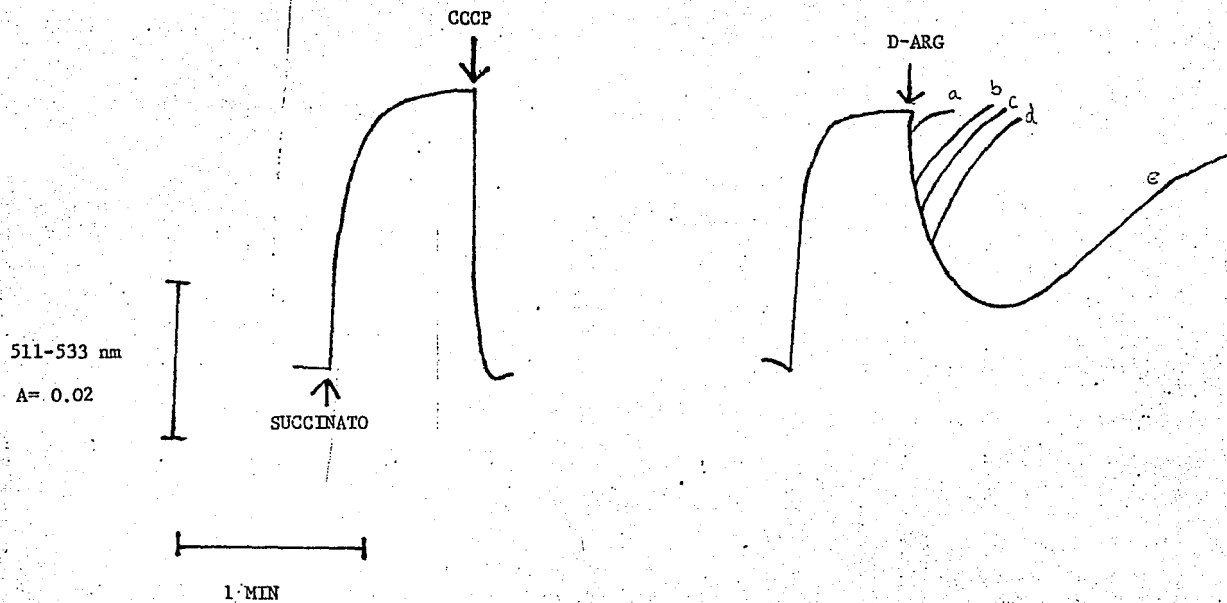


FIGURA 2

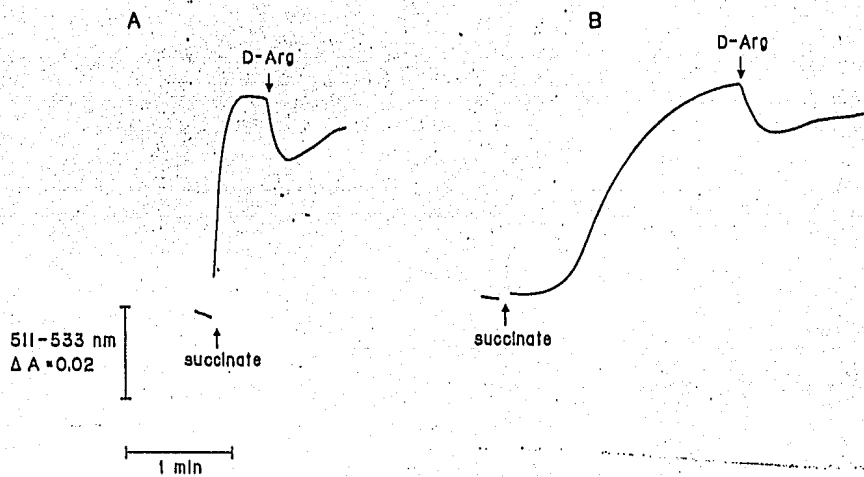
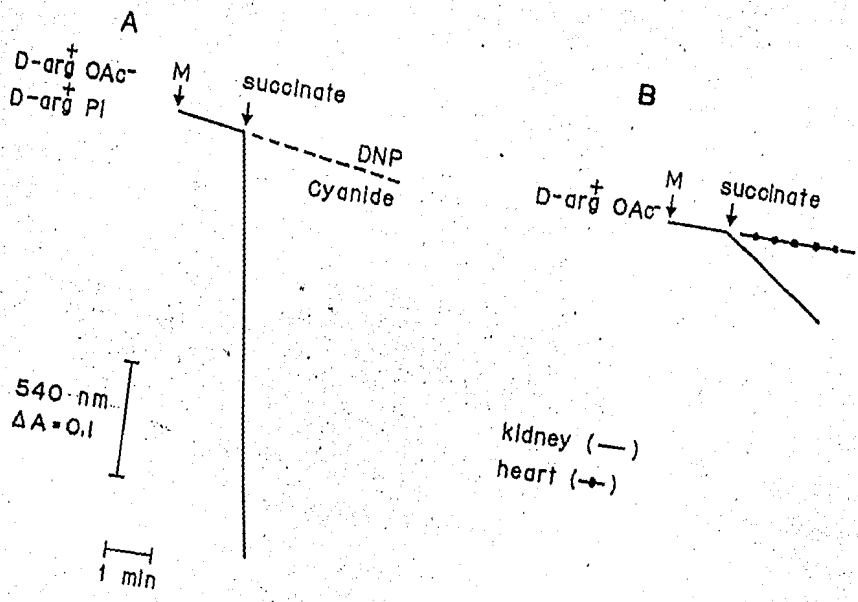


FIGURA 3

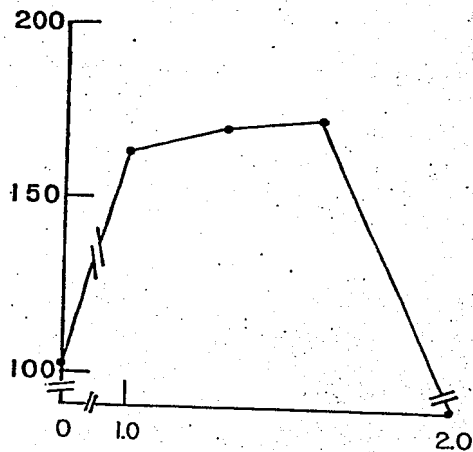
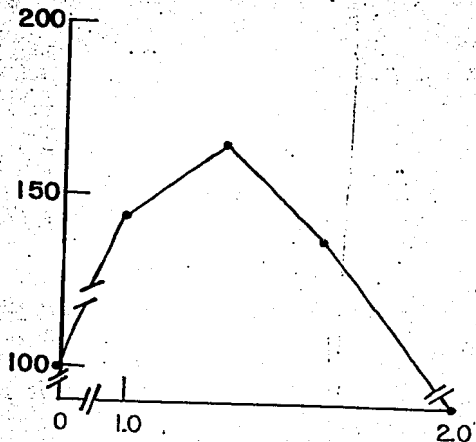


SINTESIS DE CITRULINA (% CONTROL)

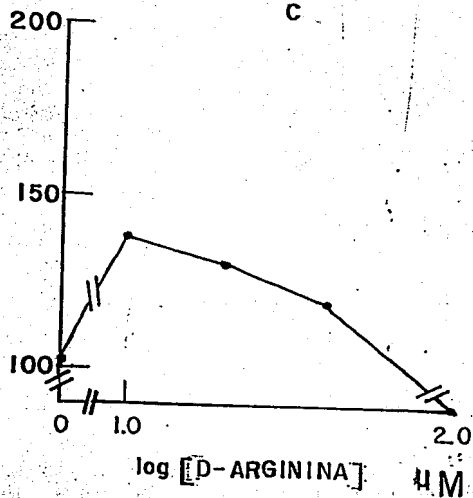
B

FIGURA 4

A



C



D

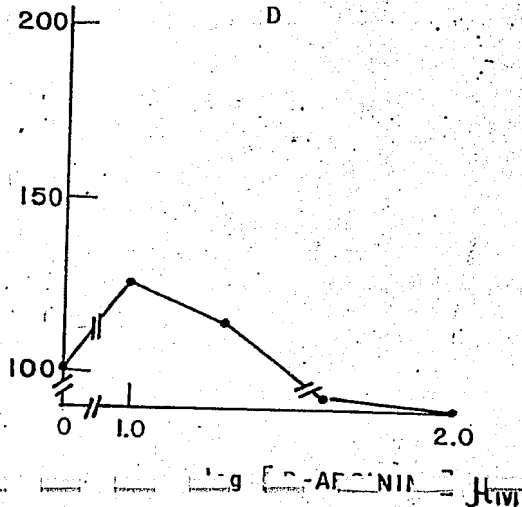


Figura 3: Efecto de varios inhibidores en el hinchamiento de mitocondrias suspendidas en sales de D-arginina, dependientes de succinato.

Las mitocondrias aisladas fueron suspendidas en 3.0 ml de soluciones de D-arginina (125 mM) conteniendo tris-HCl (5 mM), a pH 7.4 y rotenona (3 ug). Otras condiciones fueron: succinato de K (5 mM), DNP (2,4 dinitrofenol) (150 uM) y KCN (cianuro de potasio) (500 uM). Lado A: Hígado. Lado B: Corazón y riñón.

Figura 4: Efecto de la D-arginina sobre la citrulinogénesis.

Incubación de mitocondrias de hígado de rata (8 mg) en el medio descrito por Tatibana (27) a diferentes tiempos. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido perclórico (6%), para proceder a la determinación de citrulina de acuerdo con el método descrito por Boyde y col. (28).

significativos estadísticamente cuando se utiliza glutamato-malato o succinato como sustratos.

En resumen, los datos experimentales de este trabajo, demuestran que la D-arginina en el hígado de ratas: a) es incorporada activamente en mitocondrias en presencia de un gradiente electroquímico, b) a bajas concentraciones estimula la síntesis mitocondrial de citrulina, c) a altas concentraciones inhibe la síntesis mitocondrial de citrulina, d) estimula la ureogénesis en hepatocitos aislados, e) a bajas concentraciones estimula ligeramente la respiración mitocondrial, mientras que a concentraciones altas, la inhibe y f) la fosforilación oxidativa no resulta afectada en forma significativa.

Estos datos hasta donde sabemos son los primeros en la literatura mundial, que demuestran una participación fisiológica de un D-aminoácido. En nuestro laboratorio continuamos estudiando diferentes aspectos relacionados con la D-arginina.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Bender, A.F. y Krebs, H.A. (1950), Biochem. J. 46, 210-219.
- 2.- Meister, A. (1955), Adv. Enzymol. 16, 185-246.
- 3.- Krebs, H.A. (1935), Biochem. J. 29, 1620-1644.
- 4.- Krebs, H.A. (1948), Biochem. Soc. Symp. no.1, Cambridge: Cambridge University Press.
- 5.- Barker, R.F. y Hopkinson, D.A. (1977), Ann. Hum. Genet., 41, 27-42.
- 6.- Rosenfeld, M.G. y Leiter, E.H. (1977), Can. J. Biochem. 55, 66-74.
- 7.- Robinson, J.M., Briggs, R.T. y Kornowsky, M.J. (1978), J.

Cell Biol. 77, 59-71.

- 8.- Hamilton, G.A., Buckthal, D.J., Mortensen, R.M. y Zerby, K.W. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 2625-2629.
- 9.- Porter, D.J., Voet, J. y Bright, H.J. (1972), J. Biol. Chem. 247, 1951-1953.
- 10.- Dixon, M. y Klepper, K. (1965), Biochim. Biophys. Acta, 185, 368-
- 11.- Yagi, K., Ozawa, T. y Naos, M. (1969), Biochim. Biophys. Acta, 185, 31-
- 12.- Neims, A.H. (1970), Ann. Rev. Biochem., 39, 867-
- 13.- Helfman, P.M. y Bada, J.L. (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 2891-2894.
- 14.- Helfman, P.M. y Bada, J.L. (1976), Nature, 262, 279-281.
- 15.- Masters, P.M., Bada, J.L. y Zigler, J.S. Jr. (1977), Nature, 268, 71-73.
- 16.- O'Connor, C.M. y Clarke, S. (1983), J. Biol. Chem. 258, 8485-8492.
- 17.- McFadden, P.N. y Clarke, S. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2460-2464.
- 18.- Brunauer, S.L. y Clarke, S. (1986), J. Biol. Chem. 261, 12538-12543.
- 19.- Fitzpatrick, F.P. y Massay, V. (1982), J. Biol. Chem. 257, 12916-12923.
- 20.- Nishina, Y., Miura, R., Tojo, H., Miyake, Y., Natari, H. y Shiga, K. (1986), J. Biochem., 99, 329-337.
- 21.- Nishina, Y., Tojo, H. y Shiga, K. (1986), J. Biochem. 99, 673-680.
- 22.- Moreno, M.C. (1986), J. Theor. Biol. 119, 369-378.

- 23.- Schneider, W.C. y Hogeboom, G.H. (1950), J. Biol. Chem., 183, 123-128.
- 24.- Siess, E.A. (1983), Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 279-290.
- 25.- Keyser, J.W. y Vaughn, J. (1949), Biochem. J. 44, 22-23.
- 26.- Estabrook, R.W. (1967), Methods in Enzymology, (R.W. Estabrook y M. Pullman, eds.) 10, 41-47, Acad. Press New York.
- 27.- Kawamoto, S., Sonoda, T., Ohtake, A. y Tatibana, M. (1985), Biochem. J., 232, 329-334.
- 28.- Boyde, T.R.C. y Rahmatullah, M. (1980), Anal. Biochem. 107, 424-431.
- 29.- Akerman, K.E.O. y Wikstrom, M.K.F. (1976) FEBS Lett. 68, 191-198.
- 30.- Gamble, J.C. y Lehninger, A.L. (1973), J. Biol. Chem. 248, 610-618.
- 31.- Berry, N.M. y Friend, D.S. (1969), J. Cell Biol. 43, 506-520.
- 32.- Gutmann, I. y Bergmeyer, H.U. (1974) Urea en Methods of Enzymatic Analysis (H.U. Bergmeyer, ed.) Acad. Press New York, 1791-1793.
- 33.- Akerman, K.E.O. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 502, 359-366.
- 34.- Nicholls, D. y Akerman, K.E.O. (1982), Biochim. Biophys. Acta, 683, 57-88.
- 35.- Soberón, G. y Palacios, R. (1976), en: The Urea Cycle (Grisolia, S. Baguena, R. y Mayor, F. eds.), John Wiley Sons New York, 221-235.
- 36.- Bradford, N.M. y McGivan, J.D. (1980), FEBS Lett. 113, 294-298.

- 37.- Cheung, C.W. y Rajman, L. (1981), Arch. Biochem. Biophys.,
209, 643-649.
- 38.- Grisolia, S. y Cohen, P.P. (1953), J. Biol. Chem., 204,
753-757.
- 39.- Hall, L.M., Metzberg, R.L. y Cohen, P.P. (1958), J. Biol.
Chem., 230, 1013-1021.
- 40.- Shigesada, K. y Tatibana, M. (1978), Eur. J. Biochem., 84,
285-291.
- 41.- Shigesada, K., Aoyagi, K. y Tatibana, M. (1978), Eur. J.
Biochem., 85, 385-391.
- 42.- Stewart, P.M. y Walser, M. (1980), J. Biol. Chem. 255,
5270-5280.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Lemery, N. (1698) A Course of Chemistry Transl. Harris, London, 3rd edition,
- 2.- Rouelle, F.M. (1773) Journ. de Médecine, nov.
- 3.- Fourcroy, A. y Vauquelin, N. (1798) Annal. Chim., xxxi, 48; xxxii, 80.
- 4.- Prévost, M. y Dumas, J. B. (1823) Annal. Chim. xxii, 90.
- 5.- Mani, M. (1963) La découverte de l'urémie expérimentale par Jean-Louis Prévost et Jean-Baptiste Dumas, Genève, 1821. Med. Hyg. 21: 408-409.
- 6.- Werner, E.A. (1923) en: The Chemistry of Urea, (R.H.A. Plimer y F.G. Hopkins, eds.), pag.1-3, Longmans Green, N.Y.
- 7.- Wohler, F. (1828) Anal. Chim. Phys., xxxvii, 330.
- 8.- Fearon, W.R. (1926) The Biochemistry of Urea. Physiol. Rev. 6: 399-439.
- 9.- Krebs, H.A. y Henseleit, K. (1932) Untersuchungen über die harnstoffbildung in tierkörper. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 210: 33-66.
- 10.- Cohen, P.P. y Hayano, M. (1946) The conversion of citrulline to arginine (transamination) by tissue slices and homogenates. 166: 239-250.
- 11.- Grisolia, S. y Cohen, P.P. (1952) The catalytic role of carbamyl glutamate in citrulline synthesis. J. Biol. Chem. 198: 561-571.
- 12.- Jones, M.E., Spector, E. y Lipmann, F.J. (1955) Am. Chem. Soc., 77: 819-820.
- 13.- McGivan, J.D., Bradford, N.M. y Beavis, A.D. (1977) Factors influencing the activity of ornithine aminotransferase in

- isolated rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 162: 147-156.
- 14.- Gamble, J.G. y Lehninger, A.L. (1973) Transport of ornithine and citrulline across the mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 248: 610-618.
- 15.- Shigesada, K. y Tatibana, M. (1978) N-acetylglutamate synthetase from rat-liver mitochondria. Partial purification and catalytic properties. *Eur. J. Biochem.* 84: 285-291.
- 16.- Shigesada, K., Aoyagi, K. y Tatibana, M. (1978) Role of acetylglutamate in ureotelism. Variations in acetylglutamate level and its possible significance in control of urea synthesis in mammalian liver. *Eur. J. Biochem.* 85: 385-391.
- 17.- Krebs, H.A., Hems, R. y Lund, P. (1973) Some regulatory mechanisms in the synthesis of urea in mammalian liver. *Adv. Enzyme Regul.* 11: 341-377.
- 18.- Cohen, N.S., Cheung, C. y Raijman, L. (1980) The effects of ornithine on mitochondrial carbamyl phosphate synthesis. *J. Biol. Chem.* 255: 10248-10255.
- 19.- Marvil, D.K. y Leisinger, T. (1977) N-acetylglutamate synthetase of *Escherichia coli*: Purification, characterization and molecular properties. *J. Biol. Chem.* 252: 3295-3303.
- 20.- Gerhast, J.C. y Pardee, A.B. (1962) The enzymology of control by feedback inhibition. *J. Biol. Chem.* 237: 891-896.
- 21.- Pierard, A. (1966) Control of the activity of *Escherichia coli* carbamoyl phosphate synthetase by antagonistic allosteric effectors. *Science*, 154: 1572-1573.
- 22.- Abdelal, A.T. (1979) Arginine catabolism by microorganisms. *Ann. Rev. Biochem.* 33: 137-168.

- 23.- Paulus, T.J. y Switzer, R.L. (1979) Characterization of pyrimidine-repressible and arginine-repressible carbamyl phosphate synthetase from Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 137: 82-91.
- 24.- Issaly, I.M. y Issaly, A.S. (1974) Control of ornithine carbamoyltransferase activity by arginase in Bacillus subtilis. Eur. J. Biochem. 49: 485-495.
- 25.- Legrain, C., Stalon, V., Noullez, J.P., Mercenier, A., Simon, J.P., Broman, K. y Wiame, J.M. (1977) Structure and function of ornithine carbamoyltransferases. Eur. J. Biochem. 80: 401-409.
- 26.- Marshall, M. y Cohen, P.P. (1972) Ornithine transcarbamylase from Streptococcus faecalis and bovine liver. Isolation and subunit structure. J. Biol. Chem. 247: 1641-1656.
- 27.- Simon, J.P. y Stalon, V. (1976). Biochimie, 58: 1419-1421.
- 28.- Jauniaux, J.C., Urrestarazu, L.A. y Wiame, J.M. (1978) Arginine metabolism in Saccharomyces cerevisiae: subcellular localization of the enzymes. J. Bacteriol. 133: 1096-1107.
- 29.- Penninckx, M., Simon, J.P. y Wiame, J.M. (1974) Interaction between arginase and L-ornithine carbamoyltransferase in Saccharomyces cerevisiae. Purification of S. cerevisiae enzymes and evidence that these enzymes as well as rat-liver arginase are trimers. Eur. J. Biochem. 49: 429-442.
- 30.- Simon, J.P. y Stalon, V. (1978) Epiarginasic regulation in Saccharomyces cerevisiae. Citrulline, the third effector, acts at a specific binding site on the ornithine carbamoyltransferase. Eur. J. Biochem. 88: 287-295.

- 31.- Cybis, J. y Beavis, R.H. (1975) Organization and control in the arginine biosynthetic pathway of *Neurospora*. J. Bacteriol. 123: 196-202.
- 32.- Wolf, E.C. y Weiss, R.L. (1980) Acetyl glutamate kinase. A mitochondrial feedback-sensitive enzyme of arginine biosynthesis in *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 255: 9189-9195.
- 33.- Bowman, E.J. y Davis, R.H. (1977) Cellular distribution of ornithine in *Neurospora*: anabolic and catabolic steady states. J. Bacteriol. 130: 274-284.
- 34.- Mora, J., Tarrah, R. y Bojalil, L.R. (1966) On the structure and function of different arginases. Biochim. Biophys. Acta 118: 206-209.
- 35.- Williams, L.G., Bernhardt, S.A. y Davis, R.H. (1971) Evidence for two discrete carbamyl phosphate pools in *Neurospora*. J. Biol. Chem. 246: 973-978.
- 36.- Lue, P.F. y Kaplan, J.C. (1969) The aspartate transcarbamylase and carbamoyl phosphate synthetase of yeast: A multi-functional enzyme complex. Biochem. Biophys. Res. Commun. 34: 426-433.
- 37.- Williams, L.G. y Davis, R.H. (1970) pyrimidine-specific carbamyl phosphate synthetase in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 103: 335-341.
- 38.- Campbell, J.W. (1965) Arginine and urea biosynthesis in the land planarian: its significance in biochemical evolution. Nature (London) 208: 1299-1301.
- 39.- DeFelice, M., Squirer, C., Levinthal, M., Guardiola, J., Lamberti, A. y Saccarino, M. (1977) Mol. Gen. Genet. 156: 1-7.
- 40.- Martin, S.L., Zimmer, E.A., Kan, Y.W. y Wilson, A.C. (1980)

Silent -globin gene in old world monkeys. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3563-3566.

41.- Wu, T.T., Lin, E.C.C. y Tanaka, S. (1968) Mutants of Aerobacter aerogenes capable of utilizing xylitol as a novel carbon. J. Bacteriol. 96: 447-456.

42.- Volpe, P., Sawamura, R. y Strecker, H.J. (1969) J. Biol. Chem. 244: 719-726.

43.- Huggins, A.K., Skutrch, G. y Baldwin, E. (1969) Ornithine-urea cycle enzymes in Teleostean fish. Comp. Biochem. Physiol. 28: 587-602.

44.- Cohen, P.P. (1976) Evolutionary and comparative aspects of the urea biosynthesis. En The Urea Cycle (S. Grisolia, R. Bagnena y F. Mayor, eds.) Wiley Sons, NY 21-38.

45.- Smith, H.W. (1961) Fish to philosopher. En The Natural History Library Anchor Books, Doubleday, Garden City, NY.

46.- Brown, G.W. y Cohen, P.P. (1960) Comparative biochemistry of urea synthesis. 3. Activities of urea cycle enzymes in various higher and lower vertebrates. Biochem. J. 75: 82-90.

47.- Wilson, A.C., Sarich, V.M. y Maxson, L.R. (1974) The importance of gene rearrangement in evolution: evidence from studies on rates of chromosomal, protein and anatomical evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3028-3030.

48.- Marshall, M., Metzberg, R.L. y Cohen, P.P. (1961) Physical and kinetic properties of carbamyl phosphate synthetase from Frog liver. J. Biol. Chem. 236: 2229-2237.

49.- Elliot, K.R.F. y Tipton, K.F. (1974) Kinetic studies of bovine liver carbamoyl phosphate synthetase. Biochem. J. 141:

807-816.

50.- Guthohrlein, G. y Knappe, J. (1968) Structure and function of carbamoylphosphate synthetase.1. Transitions between two catalitically inactive forms and the active form. Eur. J. Biochem. 7: 119-127.

51.- Cohen, P.P. (1981) The ornithine-urea cycle: Biosynthesis and regulation of carbamyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamylase. Curr. Top. Cell Reg. 18: 1-19.

52.- Hall, L.M., Johnson, R.C. y Cohen, P.P. (1960) The presence of carbamyl phosphate synthetase in intestinal mucosa. Biochim. Biophys. Acta 37: 144-145.

53.- Marshall, M. y Cohen, P.P. (1961) An immunochemical study of carbamyl phosphate synthetase. J. Biol. Chem. 236: 718-724.

54.- Virden, R. (1972) The molecular weights of two forms of carbamyl phosphate synthetase from rat liver. Biochem. J. 127: 503-508.

55.- Rajiman, L. y Jones, M.E. (1976) Purification, composition and some properties of rat liver carbamyl phosphate synthetase (ammonia) Arch. Biochem. Biophys. 175: 270-278.

56.- Lusty, C. (1978) Carbamoylphosphate synthetase I of rat-liver mitochondria. Purification, properties, and polypeptide molecular weight. Eur. J. Biochem. 85: 373-383.

57.- Fahien L.A. y Cohen, P.P. (1964) A kinetic study of carbamyl phosphate synthetase. J. Biol. Chem. 239: 1925-1934.

58.- Elliot, K.R.F. y Tipton, K.F. (1974) Product inhibition studies on bovine liver carbamoylphosphate synthetase. Biochem. J. 141: 817-824.

59.- Kerson, L.A. y Appel, S.H. (1968) Kinetic studies on rat

liver carbamyl phosphate synthetase. J. Biol. Chem. 243: 4279-4285.

60.- Briton, H.G., Rubio, V. y Grisolia, S. (1979) Mechanism of carbamoyl-phosphate synthetase. Properties of the two binding sites for ATP. Eur. J. Biochem. 102: 521-530.

61.- Shigesada, K. y Tatibana, M. (1978) Role of acetylglutamate in ureotelism. Variations in acetyl glutamate level and its possible significance in control of urea synthesis in mammalian liver. Eur. J. Biochem. 85: 385-391.

62.- Marshall, M. (1976) Carbamyl phosphate synthetase I from Frog liver. en: The Urea Cycle (S. Grisolia, R. Baguena y F. Mayor eds.) Wiley Sons, N.Y. 133-142.

63.- Rajman, L. (1974) Citrulline synthesis in rat tissues and liver content of carbamoyl phosphate and ornithine. Biochem. J. 138: 225-232.

64.- Marshall, M. y Cohen, P.P. (1972) Ornithine transcarbamylase from Streptococcus faecalis and bovine liver. I. Isolation and subunit structures. J. Biol. Chem. 247: 1641-1653.

65.- Marshall, M. y Cohen, P.P. (1972) Ornithine transcarbamylase from Streptococcus faecalis and bovine liver. II. Multiple binding sites for carbamyl-P and L-norvaline, correlation with steady state kinetics. J. Biol. Chem. 247: 1654-1668.

66.- Marshall, M. y Cohen, P.P. (1972) Ornithine transcarbamylase from Streptococcus faecalis and bovine liver. III. Effects of chemical modifications of specific residues on ligand binding and enzymatic activity. J. Biol. Chem. 247:1669-1672.

- 67.- Lusty, C.J., Jilka, R.L. y Niestch, E.H.J. (1979) Ornithine transcarbamylase from rat liver. Kinetic, physical and chemical properties. *J. Biol. Chem.* 254: 10030-10036.
- 68.- Pierson, D.L., Cox, S.L. y Gilbert, B.E.J. (1977) Human ornithine transcarbamylase. Purification and characterization of the enzyme from normal liver and the liver of a Reye's syndrome patient. *J. Biol. Chem.* 252: 6464-6469.
- 69.- Kalousek, F., Baudoin, F. y Rosenberg, L.E. (1978) Isolation and characterization of ornithine transcarbamylase from normal human liver. *J. Biol. Chem.* 253: 3939-3944.
- 70.- Marshall, M. y Cohen, P.P. (1980) Ornithine transcarbamylases. Ordering of S-cyano peptides and location of characteristically reactive cysteinyl residues within the sequence. The essential sulfhydryl group of ornithine transcarbamylase, pH dependence of the spectra of its 2-mercuri-4-nitrophenol derivative. *J. Biol. Chem.* 255: 7287-7305.
- 71.- Meijer, A.J., Van Woerkom, G.N., Wanders, R.J.A. y Lof, C. (1982) Transport of N-acetyl glutamate in rat-liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 124: 325-330.
- 72.- Schimke, R.T. (1963) Studies on factors affecting the levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem.* 238: 1012-1018.
- 73.- Gebhardt, R. y Mecke, D. (1979) Permissive effect of dexametasone on glucago induction of urea-cycle enzymes in perfused primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 97: 29-35.
- 74.- Halestrap, A.P., Scott, R.D. y Thomas, A.P. (1980) *Int. J. Biochem.* 11: 97-105.

- 75.- McLean, P. y Gurney, M.W. (1963) Effect of adrenalectomy and of growth hormone on enzymes concerned with urea synthesis in rat liver. *Biochem. J.* 87: 96-104.
- 76.- Cohen, P.P. (1970) Biochemical differentiation during amphibian metamorphosis. *Science* 168: 533-543.
- 77.- Cohen, P.P., Drucker, R.F. y Morris, S.M. (1978) en *Hormonal proteins and peptides* (C.H. Li ed.) Academic Press, N.Y. 6: 273-381.
- 78.- Edkins, E. y Raiha, N.C.R. (1976) Changes in the activities of the enzymes of urea synthesis caused by dexamethasone and dibutyryladenosine 3':5'-cyclic monophosphate in foetal rat liver maintained in organ culture. *Biochem. J.* 160: 159-162.
- 79.- Raiha, N.C.R. (1976) Developmental changes of urea-cycle enzymes in mammalian liver. En: *The Urea Cycle* (S. Grisolia, R. Bagnuola y F. Mayor, eds.) Wiley Sons, N.Y. 261-272.
- 80.- Snodgrass, P.J., Lin, R.C., Muller, W.A. y Aoki, T.J. (1978) Induction of urea cycle enzymes of rat liver by glucagon. *J. Biol. Chem.* 253: 2748-2753.
- 81.- Shambaugh, G.E. III, Balinsky, J.B. y Cohen, P.P. (1969) Synthesis of carbamyl phosphate in amphibian liver in vitro. The effect of thyroxine. *J. Biol. Chem.* 244: 5295-5308.
- 82.- Wixom, R.L., Reddy, N.K. y Cohen, P.P. (1972) A concerted response of the enzymes of urea biosynthesis during thyroxine-induced metamorphosis of *Rana catesbeiana*.
- 83.- Ross, B.D., Hems, R., Freedland, R.A. y Krebs, H.A. (1967) Carbohydrate metabolism of the perfused rat liver. *Biochem. J.* 105: 869-875.

- 84.- Exton, J.H., Mallette, L.E., Jefferson, L.S., Wong, E.H.A., Friedman, N., Miller, T.B. y Park, C.R. (1970) Rec. Prog. Horm. Res. 26: 411-461.
- 85.- Siess, A.E., Brocks, D.G. y Wieland, O.H. (1978) Distinctive effects of glucagon on gluconeogenesis and ketogenesis in hepatocytes isolated from normal and biotin-deficient rats. Biochem. J. 172: 517-521.
- 86.- Mallette, L.E., Exton, J.H. y Park, C.R. (1969). Control of gluconeogenesis from amino acids in the perfused rat liver. J. Biol. Chem. 244: 5713-5723.
- 87.- Triebwasser, K.C. y Freedland, R.A. (1977). The effect of glucagon on ureagenesis from ammonia by isolated rat hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76: 1159-1165.
- 88.- Yamazaki, R.K. y Graetz, G.S. (1977). Glucagon stimulation of citrulline formation in isolated hepatic mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 178: 19-25.
- 89.- Bryla, J., Harris, E.J. y Plumb, J.A. (1977). The stimulatory effect of glucagon and dibutyryl cyclic AMP on ureagenesis and gluconeogenesis in relation to the mitochondrial ATP content. FEBS Lett. 80: 443-448.
- 90.- Schimke, R.T. (1962). Adaptative characteristics of urea cycle enzymes in the rat. J. Biol. Chem. 237: 459-468.
- 91.- Schimke, R.T. (1962). Differential effects of fasting and protein-free diets on levels of urea cycle enzymes in rat liver. J. Biol. Chem. 237: 1921-1924.
- 92.- Nuzum, C.T. y Snodgrass, P.J. (1971). Urea cycle enzyme adaptation to dietary protein in primates. Science, 172: 1042-1043.

93.- Tatibana, M., Shigesada, K. y Mori, M. (1976). Acetyl glutamate synthetase. en: The Urea Cycle (S. Grisolia, R. Baguena y F. Mayor, eds.), John Wiley Sons, New York 95-105.

94.- Nicolletti, M., Guerri, C. y Grisolia, S. (1977). Turnover of carbamyl-phosphate synthetase of other mitochondrial enzymes and of rat tissues. Effect of diet and of thyroidectomy. Eur. J. Biochem. 75: 583-592.

95.- Shore, G.C., Carignani, P. y Raymond, Y. (1979). In vitro synthesis of a putative precursor to the mitochondrial enzyme, carbamyl phosphate synthetase. J. Biol. Chem. 254: 3141-3144.

96.- Mori, M., Miura, S., Tatibana, M. y Cohen P.P. (1979). Cell-free synthesis and processing of a putative precursor for mitochondrial carbamyl phosphate synthetase I of rat liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5071-5075.

97.- Conboy, J.G., Kalousek, F. y Rosenberg, L.E. (1979). In vitro synthesis of a putative precursor of mitochondrial ornithine transcarbamylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5724-5727.

98.- Mori, M., Miura, S., Tatibana, M. y Cohen, P.P. (1980). J. Biochem. (Tokyo), 88: 1829-1834.

99.- Mori, M., Miura, S., Tatibana, M. y Cohen, P.P. (1980). Characterization of a protease apparently involved in processing of pre-ornithine transcarbamylase of rat liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 7044-7048.

100.- Anderson, P.M. (1980). Glutamine and N-acetyl glutamate dependent carbamoyl phosphate synthetase in Elasmobranchs. Science, 208: 291-293.

- 101.- Ratner, S. (1954). Urea synthesis and metabolism of arginine and citrulline. *Adv. Enzymol.*, 15: 319-387.
- 102.- Petrack, B. y Ratner, S. (1958). Biosynthesis of urea. VII. Reversible formation of argininosuccinic acid. *J. Biol. Chem.*, 233: 1494-1500.
- 103.- Rochovansky, O. y Ratner, S. (1967). Biosynthesis of urea. XII. Further studies on argininosuccinate synthetase: Substrate affinity and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 242: 3839-3849.
- 104.- Rochovansky, O. y Ratner, S. (1968). Effects of analogues of aspartic acid on enzymes of urea synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 127: 688-704.
- 105.- Rochovansky, O. y Ratner, S. (1961). Biosynthesis of urea. IX. Further studies on mechanism of argininosuccinate synthetase reaction. *J. Biol. Chem.* 236: 2254-2260.
- 106.- Ratner, S. (1974). Enzymes of arginine and urea synthesis. en: *The Urea Cycle* (S. Grisolia, R. Baguena y F. Mayor, eds.) Wiley Sons, New York, 1-83.
- 107.- Ratner, S. y Papas, A. (1949). Biosynthesis of urea I. Enzymatic mechanism of arginine synthesis from citrulline. *J. Biol. Chem.* 179: 1183-1199.
- 108.- Ratner, S. y Petrack, B. (1951). Biosynthesis of urea III. Further studies on arginine synthesis from citrulline. *J. Biol. Chem.* 191: 693-705.
- 109.- Ratner, S. y Petrack, B. (1953). The mechanism of arginine synthesis from citrulline in kidney. *J. Biol. Chem.* 200: 175-185.
- 110.- Cusworth, D.C. y Dent, C.E. (1960). Renal clearances of amino acids in normal adults and in patients with aminoaciduria. *Biochem. J.* 74: 550-561.

- 111.- Wiame, J.M. (1974). Proc. FEBS Meet. p 161-177.
- 112.- De Reuter, H. y Kolloffel, C. (1983). Arginine catabolism in the cotyledons of developing and germinating pea seeds. Plant. Physiol., 73: 525-528.
- 113.- Husson, A., Bouazza, M., Buquet, C. y Vaillant, R. (1984). Precocious induction of arginase in primary cultures of fetal rat hepatocytes. In Vitro, 20-4: 314-320.
- 114.- Cederbaum, S.D., Shaw, K.N.F. y Valente, M. (1977). Hyperargininemia. J. Pediatr. 90: 569-573.
- 115.- Cederbaum, S.D., Shaw, K.N.F., Spector, E.B., Snodgrass, P.J., Verity, M.A. y Sugarman, G.I. (1979). Hyperargininemia due to a arginase deficiency. Pediatr. Res. 13: 827-833.
- 116.- Spector, E.B., Rice, S.C.H. y Cederbaum, S.D. (1983). Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase-deficient patients. Pediatr. Res. 17: 941-944.
- 117.- Terheggen, H.G., Schwank, A., Lowenthal, A., Van Sande, N. y Colombo, J.P. (1969). Hyperargininämie mit arginasedefekt: eine neue familiäre stoffwechselstörung. I. Klinische Befunde. Z. Kinderheilk, 107: 298-323.
- 118.- Adriaenssens, K. y Terheggen, H.G. (1984). Hyperargininemia: The rats as a model for the human disease and the comparative response to enzyme replacement therapy with free arginase and arginase-loaded erythrocytes in vivo. Int. J. Biochem. 16: 779-786.
- 119.- Spector, E., Kern, R.M., Haggerty, D.F. y Cederbaum, S.D. (1985). Differential expression of multiple forms of arginase in cultured cells. Mol. Cell. Biochem. 66: 45-53.

- 120.- Schneider, W.C. y Hogeboom, G.H. (1950). Intracellular distribution of enzymes. V: Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. J. Biol. Chem. 183: 123-128.
- 121.- Siess, E.A. (1983). Influence of isolation media on the preservation of mitochondrial functions. Hoppe Seylers Z. Physiol. 364: 279-290.
- 122.- Cleland, K.W. y Slater, E.C. (1953). Respiratory granules of heart muscle. Biochem. J. 53: 547-556.
- 123.- Keyser, J.W. y Vaughn, J. (1949). Turbidities in the estimation of serum proteins by the biuret method. Proc. of the Biochemical Society, Biochem. J. 44: xxii.124.-
- 124.- Estabroock, R.W. (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios, en: Methods in Enzymology, (R.W. Estabroock y Pullman, M.E., eds.) 10: 41-47.
- 125.- Corvera, S. y Garcia-Sáinz, J.A. (1982) Vasopressin and angiotensin II stimulate ureogenesis through increased mitochondrial citrulline production. Life Sci., 31: 2493-2498.
- 126.- Boyde, T.R.C. y Rahmatullah, M. (1980) Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. Anal. Biochem., 107: 424-431.
- 127.- Hogeboom, G.H., Schneider, H.C. y Pallade, G.E. (1948). J. Biol. Chem. 172: 619-636.
- 128.- Leuthardt, F. y Muller, A.F. (1948). Experientia, 4: 478-480.
- 129.- Siess, E.A., Fahimi, F.M. y Wieland, O.H. (1981). Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 362: 1643-1651.

- 130.- Dodgson, S.J., Forster, R.E. Showed, D.A. y Storey, B.T. (1983). Contribution of matrix carbonic anhydrase to citrulline synthesis in isolated Guinea Pig liver mitochondria.
- 131.- Dodgson, S.J., Forster, R.E., Storey, B.T. y Mela, L. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5562-5566.
- 132.- Hamman, H.C., y Haynes, C.R. Jr. (1983). Hormonal regulation of mitochondrial function. Description of a system capable of mimicking several effects of glucagon. Biochim. Biophys. Acta, 724: 241-250.
- 133.- Friedman, N., Mayekar, M. y McMillin, W.J. (1980). The effects of glucagon and epinephrine on two preparations of cardiac mitochondria. Life Sci., 26: 2093-2098.
- 134.- Gautier, C., Habechi, Z., Belbekouche, M. y Vaillant, R. (1985). Effects of corticosteroids and pancreatic hormones on carbamyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamylase activities in fetal rat liver. Biology of the Neonate, 48: 285-291.
- 135.- Laguna, J. y Piña, E. (1979). Bioquímica, Libro de texto, pag. 730-733.
- 136.- Illnerova, H. (1966). The effect of adrenalectomy and starvation on arginase and ornithine transcarbamylase activities in the liver of rat during development. Physiol. Biochem. 15: 23-26.
- 137.- Bradford, N.M. y McGivan, J.D. (1980). Evidence for the existence of an ornithine/citrulline antiporter in rat liver mitochondria. FEBS Lett. 113: 294-298.
- 138.- Mora, J., Martuscelli, J., Ortiz-Pineda, J. y Soberón, G.

(1965). *Biochem. J.* 96: 28-35.

139. - Hodges, F.A., Kitchings, L. y Eller, A.G. (1983). The uptake of ornithine and lysine by rat liver mitochondria.

Biochem. Med. 30: 313-321.

140. - Bryla, J. y Harris, E.J. (1976). Accumulation of ornithine and citrulline in rat liver mitochondria in relation to citrulline formation. *FEBS Lett.* 72: 331-336.

141. - Freedland, R.A., Crozier, G.L., Hicks, B.L. y Meijer, A.J. (1984). Arginine uptake by isolated rat liver mitochondria.

Biochim. Biophys. Acta. 802: 407-412.