

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE CIENCIAS.

Departamento de Biología.

INTEGRACION DE LA ARGINASA UREOTELICA CON  
LA VIA DE BIOSINTESIS DE ARGININA.



EXAMENES  
PROFESIONALES

T E S I S.

Que para obtener el título de  
BIOLOGO  
presenta.

CARLOS HUITRON VARGAS.

BIBLIOTECA CENTRAL  
U. N. A. M.



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 esta 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.

El presente trabajo fue elaborado en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M bajo la dirección del Dr. Guillermo Soberón Acevedo.

Agradezco al Sr. Dr. Guillermo Soberón su ayuda y dirección en la realización de esta tesis. Así como al Dr. Rafael Palacios y la Srta. Q.F.B. Mercedes Baca por su participación en el mismo.

A MI MADRE Y HERMANOS.

## INTRODUCCION.

El fenómeno biológico se caracteriza por una constante interacción de moléculas pequeñas y macromoléculas específicas; como las proteínas y los ácidos nucleicos que a su vez se interaccionan entre si. Estos compuestos contienen en su estructura nitrógeno de lo que resulta claro la importancia de este elemento en la economía de los sistemas vivos. Los componentes de que están formados estos sistemas son complejos, y en su mayor parte sujetos a un constante recambio, es decir una continua construcción y destrucción siendo necesario un constante suministro de nitrógeno para la síntesis de los componentes nitrogenados.

Los compuestos nitrogenados que tienen importancia biológica se encuentran en un estado de oxidación de  $-3$ , como el amoníaco o moléculas que resultan de la sustitución de uno o más de sus átomos de hidrógeno (Nason, 1962). Los animales superiores han perdido la capacidad de reducir el nitrógeno molecular y otros compuestos inorgánicos hasta amoníaco; por lo que necesitan que llegue a ellos el nitrógeno en este estado de oxidación (Nasón, 1962). Su fuente principal de nitrógeno la constituyen las proteínas de la dieta, las cuales son degradadas hasta aminoácidos en el tubo digestivo y absorbidos por la mucosa intestinal. También puede pasar amoníaco a través de la -- mucosa. Los vertebrados utilizan el amoníaco o compuestos con nitrógeno en su molécula para sintetizar aminoácidos, proteínas, purinas, pirimidinas y polinucleótidos.

El nitrógeno es manejado en los organismos principalmente , en la forma de amonio ( $\text{NH}_4^-$ ) y como otros metabolitos está sujeto a un constante recambio (Cohen, y Brown, 1960). Entre los procesos que utilizan amonio tenemos:

- a) Deshidrogenasa glutámica. - Formación de glutamato a partir de cetoglutarato y amonio.
- b) Glutamina sintetasa. - Formación de glutamina a partir de glutanato y amonio.
- c) Carbamil fosfato sintetasa. - Síntesis de carbamil fosfato a partir de  $\text{CO}_2$  ATP y  $(+)\text{NH}_4$  glutamina o amoniaco.

y entre los procesos metabólicos que liberan amonio se encuentran:

- a) La desaminación oxidativa de los aminoácidos.
- b) La deshidratación de la serina, treonina y homoserina.
- c) La desulfidación de la cisteína y la homocisteína.
- d) Formación del ácido urocánico a partir de histidina.
- e) La desaminación de la glutamina y de la asparagina.
- f) La desaminación hidrolítica de nucleótidos nucleosidos, aminopurinas y aminopirimidinas.

Puesto que los animales superiores son incapaces de sintetizar algunos aminoácidos, los llamados indispensables, estos tienen que ser provistos por las proteínas de la dieta, que además aportan gran cantidad de aminoácidos dispensables. Muchos de estos constituyen fuente de

energía por lo que su grupo amino se libera en forma de amoniaco lo cual causa una acumulación del metabolito. Puesto que el amoniaco es un compuesto neurotóxico en animales superiores es necesario mantenerlo en concentraciones bajas. Este problema ha sido resuelto mediante la adquisición de efectivos mecanismos excretores de amoniaco, a través de selección natural y resulta especialmente interesante desde el punto de vista evolutivo el hecho de que la "forma" de excreción esté en relación con el habitat. De esta manera han surgido tres formas de excreción nitrogenada: el amonotelismo, el ureotelismo y el uricotelismo (Cohen y Brown, 1960).

a) Amonotelismo.

En el cual el nitrógeno se excreta principalmente como amoniaco; esta forma se encuentra en animales acuáticos, ya que el amoniaco puede difundir fácilmente.

b) Ureotelismo.

En este caso el amoniaco no puede difundir libremente y se transforma en urea, metabolito muy soluble que no es tóxico y se excreta fácilmente. Este habito de excreción nitrogenada lo encontramos en animales terrestres principalmente.

c) Uricotelismo.

En este caso el nitrógeno se excreta principalmente como ácido úrico y se encuentra en animales terrestres que habitan lugares áridos, como los reptiles. Se presenta también en las aves.

La urea se biosintetiza a través de un ciclo metabólico conocido como ciclo de la urea, de la ornitina o de Krebs-Henseleit, y está formado por las actividades de 5 enzimas: carbamil fosfato sintetasa, ornitina transcarbamilasa, arginino succínico sintetasa, arginino - succinasa y arginasa. ( Fig. 1 ).

En el ciclo, la ornitina funciona como acarreador o transportador, ya que al final se restituye. Es decir interviene eficientemente en la producción de urea, participando en cantidades catalíticas.

El primer paso en la biosíntesis de urea es la formación de carbamil fosfato a partir de dióxido de carbono y amoníaco en presencia de la enzima carbamil fosfato sintetasa. Se ha encontrado que tiene un peso molecular de 325,000 y está formada por subunidades. Requiere N-acetil glutámico como cofactor, consume dos moléculas de ATP y tiene un Km bajo para amoníaco (Cohen y cols. 1966).

La siguiente reacción está a cargo de la enzima ornitino transcarbamilasa que cataliza la síntesis de L-citrulina a partir de ornitina y el carbamil fosfato anteriormente formado, liberándose fosfato inorgánico en la reacción. La reacción no es reversible (Burnett y Cohen, 1957).

Después viene la formación del L-argininosuccinato por condensación del L-aspartato con la L-citrulina mediante la acción de la enzima argininosuccinato sintetasa.

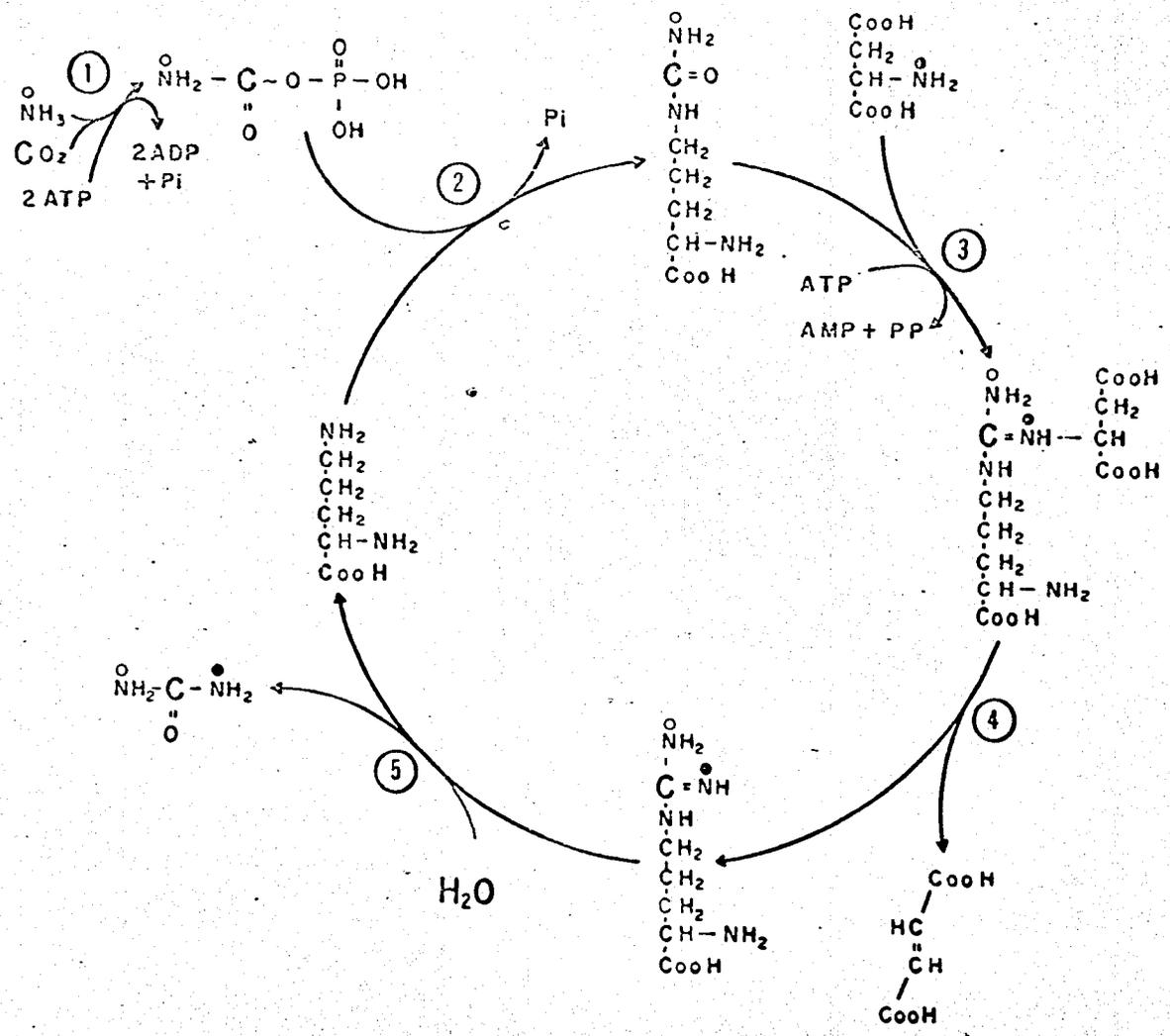
Esta enzima ha sido parcialmente purificada del

## FIGURA 1.

### Ciclo de Biosíntesis de la Urea.

Puede apreciarse que la urea se forma a partir de  $\text{CO}_2$  (carbono con símbolo de línea gruesa), amoníaco (  $\circ$  ) y el grupo amino (  $\bullet$  ) del ácido aspártico, a través de varios intermediarios. Las actividades enzimáticas que intervienen son:

Carbamil fosfato sintetasa ( 1 ), Ornitino Transcarbamilasa ( 2 ), Arginino succinico sintetasa ( 3 ), Arginino succinasa ( 4 ) y Arginasa ( 5 ).

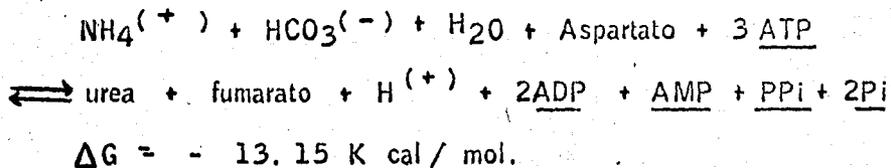


hígado y del riñón de mamíferos (Ratner y Petrack, 1953) se encuentra presente también en el hígado de anfibios (Cohen y Brown, 1958).

El L-arginosuccinato forma L-arginina y fumarato en presencia de la enzima arginino succinasa, por una ruptura no hidrolítica. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y en los mamíferos se localiza en el hígado y en riñón (Ratner, 1959).

Finalmente el ciclo se cierra con la hidrólisis de la arginina por la Arginasa, produciendo urea y restituyendo la ornitina inicial. La enzima se encuentra en forma abundante en el hígado de mamíferos; es altamente específica pues además de arginina, solamente hidroliza canavanina. Por sus características, es sumamente interesante y muy importante en el proceso evolutivo del ureotelismo.

En cuanto a la energética del ciclo; consume cuatro enlaces de alta energía y es fuertemente exergónico por lo que su dirección está cargada hacia la formación de urea (Cohen y Brown, 1960). Y se ha encontrado que tiene un cambio de energía libre de:



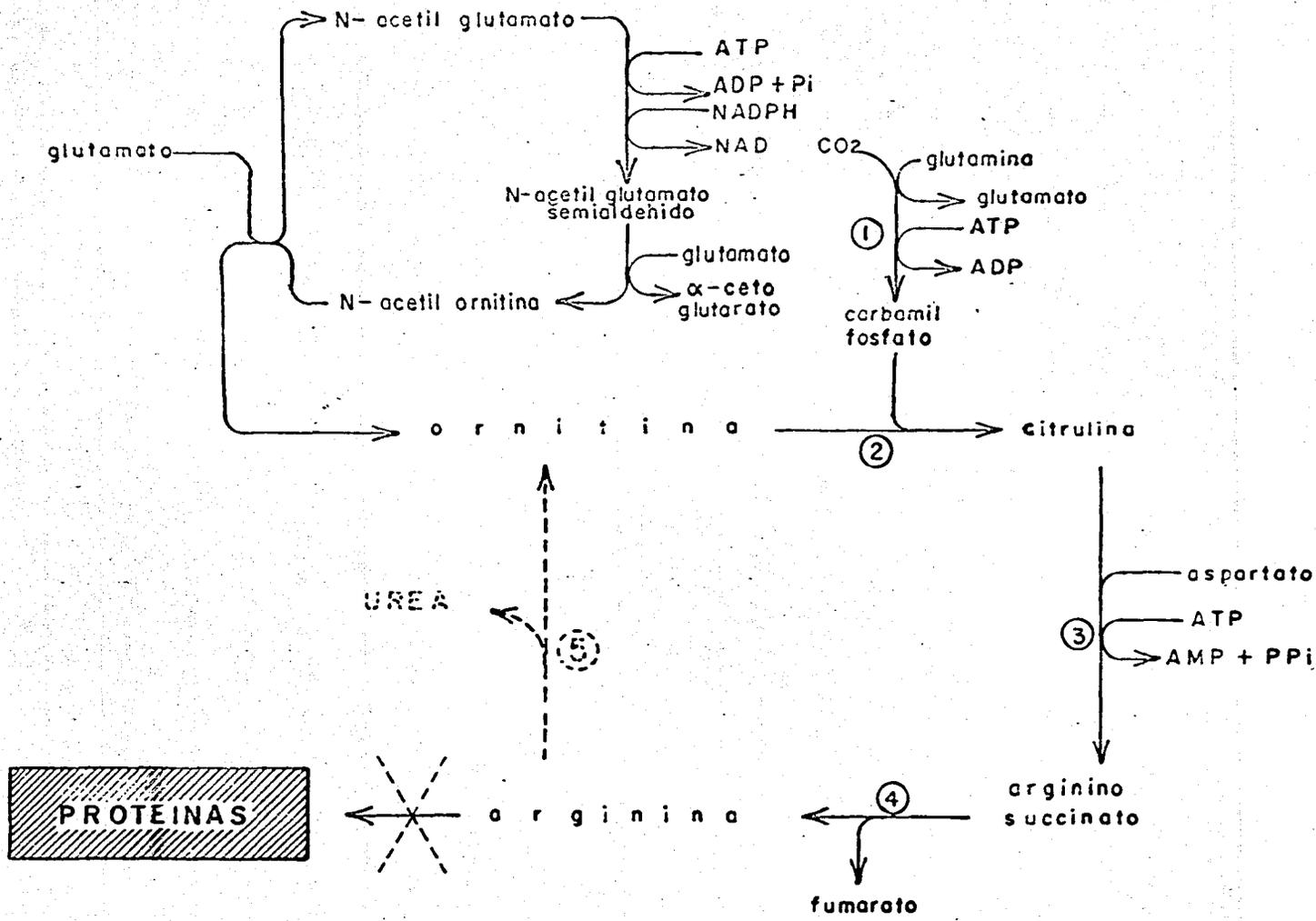
Es importante mencionar que el ciclo se deriva de la vía unidireccional de biosíntesis de arginina, destinada a la síntesis -

de las proteínas. La ruta que se sigue para la síntesis de arginina, parte de ácido glutámico, formando ornitina a través de intermediarios acetilados, ésta se transforma en arginina mediante las mismas reacciones descritas anteriormente.

Parecería que a esta vía solo le falta la actividad de arginasa para formar el ciclo de la urea. Sin embargo, se ha encontrado que la carbamil fosfato sintetasa de la vía unidireccional que sintetiza arginina es diferente a la que se encuentra en animales ureotélicos, ya que consume solamente 1 mol. de ATP y utiliza fundamentalmente glutamina en vez de amonio (Cohen, 1966). También se ha encontrado que la arginasa que se encuentra en animales ureotélicos es diferente a la que se encuentra en los uricotélicos y en *N. crassa*. (Mora, Tarrab, Martuscelli y Soberón, 1965; Tarrab, Mora y Bojalil, 1966). La primera tiene un Km más bajo para arginina, no se inhibe con p- cloromercuribenzoato y es estable durante diálisis. Un anticuerpo preparado contra la arginasa purificada del hígado de la rata tiene reacción cruzada con las arginasas de otros animales ureotélicos estudiados (vaca, perro, gato, conejo, ratón, hombre, caballo, rana y sapo). Tiene un cociente de hidrólisis L-arginina/L-canavanina de 1.5 mientras que uricotélica lo tiene de 7. Su peso molecular es de 138,000 determinado por análisis en gradiente de sacarosa, siendo de 270,000; el de la uricotélica (Greenberg, Bagot y Roholt, 1956; Roholt y Greenber, 1956; Mora, Tarrab y Bojalil, 1966; Soberón, Ortíz-Pineda y Tarrab, 1967).

## FIGURA 2.

Vía de biosíntesis de arginina en *N. crassa*. Los números indican las actividades enzimáticas señaladas en la figura 1 con los mismos números para destacar su participación en la vía unidireccional de formación de arginina para la síntesis de proteínas. Debe notarse que la Carbamil fosfato sintetasa en este caso utiliza glutamina y no amoníaco, además de consumir solamente una molécula de ATP, se ha señalado con línea punteada la actividad de la arginasa para destacar que la presencia de esta enzima sería suficiente para integrar el ciclo. Por lo demás arginasa es una enzima inducible en *N. crassa* y no hay ciclo funcionando de la urea (Ver texto).



Por otro lado se ha visto que no basta la presencia de todas las actividades del ciclo para que éste funcione como tal, como en N. crassa donde la arginasa no hidroliza a la arginina formada a partir de citrulina y aspártico, pero si la arginina añadida al medio de incubación, ( Cañedo, Martuscelli y Mora, 1967; Castañeda, Martuscelli y Mora, 1965 ).

El hecho de que en los animales ureotélicos el ciclo funciona adecuadamente y que en N. erassa donde se encuentran todas las actividades del ciclo y éste no funciona formando urea, aunado al hecho de encontrar diferencias entre las arginasas de estos sistemas, hacen de especial interés el estudio de la integración de la arginasa con las enzimas que biosintetizan arginina.

Existen evidencias que sugieren una integración de las enzimas que biosintetizan arginina con la arginasa de los animales - uricotélicos. Si a una rata se le administra citrulina ureido  $^{14}\text{C}$  se incorpora poco como arginina en proteína del hígado mientras que en -- proteínas del riñón la incorporación es mayor. En cambio si se administra arginina marcada con  $^{14}\text{C}$  en el grupo guanido, la incorporación de la marca en proteínas del riñón es sustancial al respecto a la incorporación en proteínas del hígado (Rogers y Freedland, 1968).

El objeto del presente trabajo es obtener mayor evidencia sobre la integración de la arginasa hepática de la rata con las enzimas que biosintetizan arginina.

### HIPOTESIS DE TRABAJO

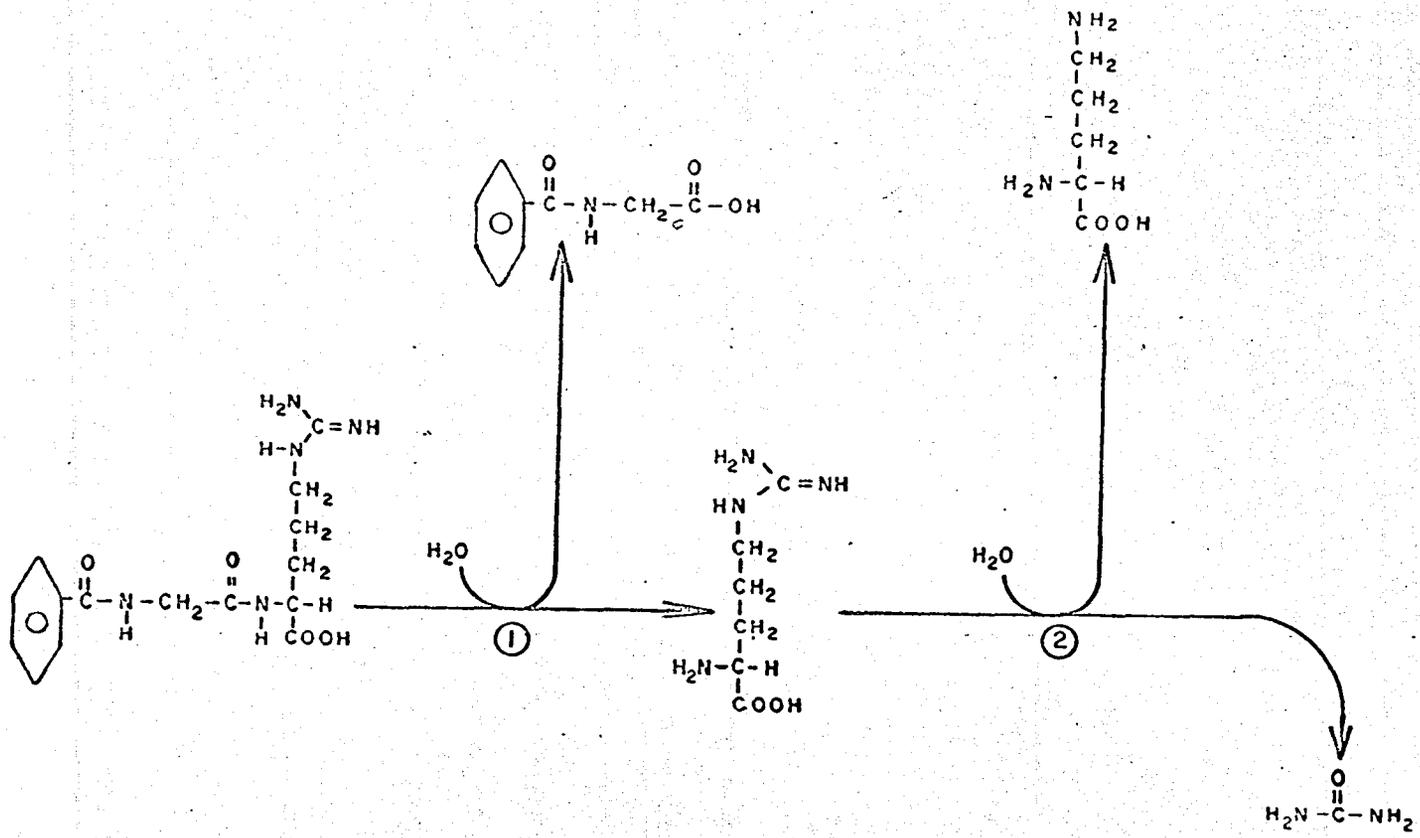
El criterio utilizado para juzgar la integración de la arginasa ha sido valorando la síntesis y la hidrólisis de la arginina. Si existe una relación directa de la arginasa con las enzimas que forman arginina es de suponerse que el aminoácido al sintetizarse queda en una concentración mayor cerca de la arginasa, siendo así más fácilmente hidrolizado. Por el contrario si tal relación no existiera, la arginina llegará en una concentración menor al sitio activo de la arginasa, de tal suerte que la hidrólisis sería menos eficiente que en el caso anterior.

Se ha tratado de explorar dicha posibilidad mediante el estudio de la síntesis e hidrólisis de la arginina, en homogeneizado de hígado de rata como sistema experimental. Este sistema teniendo los precursores adecuados (citrulina, aspártico, ATP y  $Mg^{++}$ ), funciona eficientemente formando e hidrolizando arginina; cabe preguntarse si sería igualmente eficiente la hidrólisis de la arginina en presencia de otra arginina no sintetizada a partir de citrulina. Es decir se le plantea a la arginasa la posibilidad de elegir entre dos argininas: la "endógena" (sintetizada a partir de citrulina y ácido aspártico) y la "exógena" (proveniente de otra fuente). Se escogió como fuente de producción exógena un sistema enzimático diferente a la endógena, esto es, la hidrólisis del péptido; Hipuril-L-arginina por la carboxipeptidasa "B" produciéndose arginina e hipurato (Fig. 3).

FIGURA 3. <sup>6</sup>

Producción de arginina exógena a partir de hipuril-L-arginina. Los números representan a las actividades enzimáticas:

Carboxipeptidasa B (1) y Arginasa (2).



Para rastrear a la arginina endógena se administró citrulina marcada con  $^{14}\text{C}$  en el ureido, quedando así marcados los metabolitos arginino succínico, arginina y urea. De esta forma se tienen 2 flujos de producción de arginina: el endógeno radioactivo y el exógeno no marcado. ( Fig. 4 ).

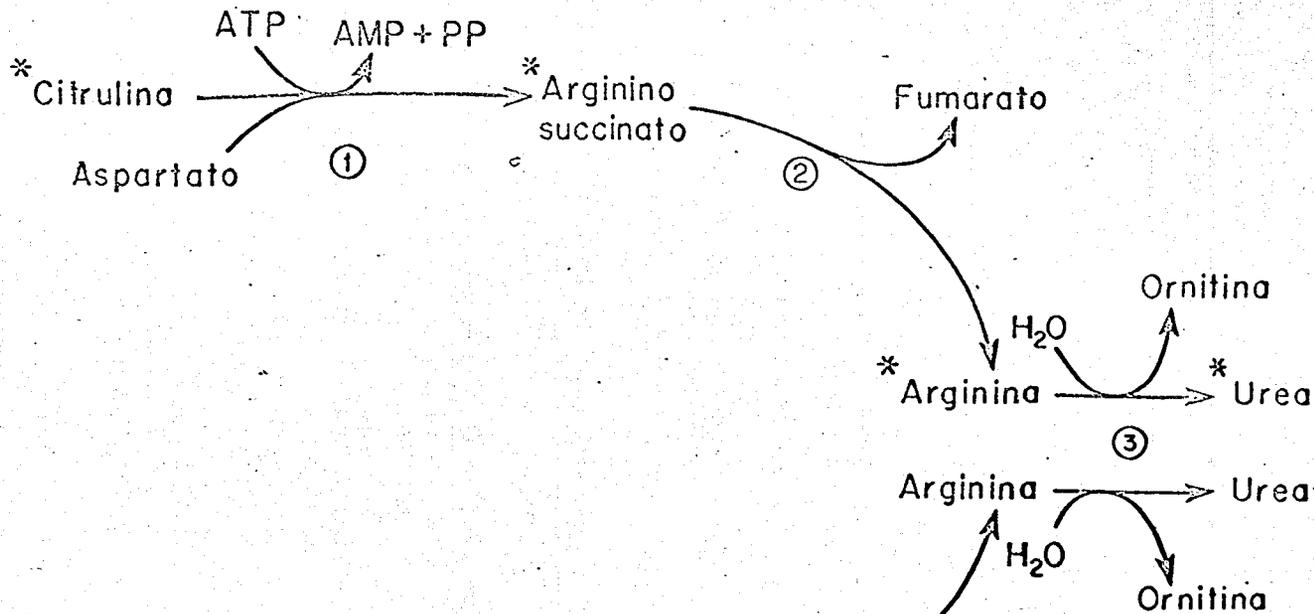
Es de esperarse que si existe integración o acoplamiento de la arginasa de acuerdo con este criterio, habrá una mayor hidrólisis de la arginina endógena marcada que de la exógena fría. Si es preferente la hidrólisis de la arginina endógena la actividad específica de la arginina será menor que la de urea, y en caso de que no se hidrolice preferentemente, la actividad específica de la arginina será igual a la de la urea, siempre y cuando se mantenga una relación constante entre ambos flujos.

FIGURA 4.

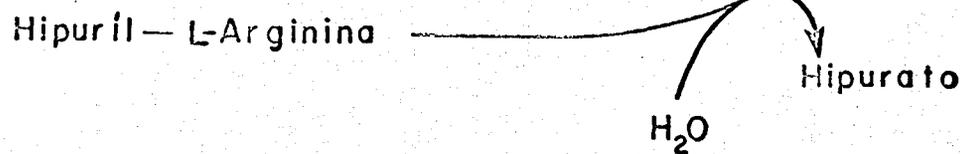
Esquema de producción de argininas; endógena (I) y exógena (II). Las actividades enzimáticas presentes en el - homogeneizado son :

Arginino succínico sintetasa (1), Arginino succinasa (2) y Arginasa (3). Se agregó la carboxipeptidasa B purificada (4). El asterisco indica los intermediarios marcados con  $^{14}\text{C}$ , administrando citrulina ureido  $^{14}\text{C}$ .

I



II



## MATERIAL Y METODOS.

### Animales.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, con peso entre 150-250 g. Fueron alimentadas con una dieta comercial (Purina Chow) y sacrificadas por decapitación.

### Homogeneizados de hígado.

Inmediatamente después de sacrificados los animales se les extrajo el hígado, se lavaron con agua destilada fría y se colocaron en hielo. Los demás pasos se llevaron a cabo a una temperatura de 4°C.

Ya pesados se homogeneizaron en agua destilada y desionizada durante 2 minutos en un homogeneizador de Potter-Elvehjem. Se centrifugó el homogeneizado durante 10 minutos a 5,000 X g. Después de centrifugado se decantó pasando el sobrenadante por un embudo con algodón a fin de eliminar una ligera capa de lípidos que se forma en la superficie.

El filtrado se aforó con agua destilada y desionizada fría, a una concentración final de 10% peso en volumen.

### Sistema de incubación para medir la síntesis e hidrólisis de arginina endógena y exógena.

El estudio se hizo midiendo la producción de arginina y urea en función del tiempo, así como la actividad específica -

de ambos. El sistema contiene 120 mg. de tejido hepático (homogeneizado de 500 X 2) 12 umoles de L-citrulina, ureido  $^{14}\text{C}$  (actividad específica de 29,000 rpm/umola) ajustado a pH 7.0, 20 umolas de ácido-L-aspartico ajustado a pH 7.0 20 umolas de ATP, ajustado a pH 7.0 20 umolas de  $\text{Mg SO}_4$ , 12 umolas de hipuril L-arginina, 4 ug de -- carboxipeptidasa " B " y 200 umolas de solución amortiguadora de fosfato de potasio a pH 7.0 en un volumen final de 4.0 ml. La temperatura de incubación fué de  $37^\circ\text{C}$ . Al terminar la incubación fue parada la reacción con 10.0 ml. de solución saturada de ácido pícrico.

Determinación de urea, citrulina, arginina e hipuril-

L- arginina.

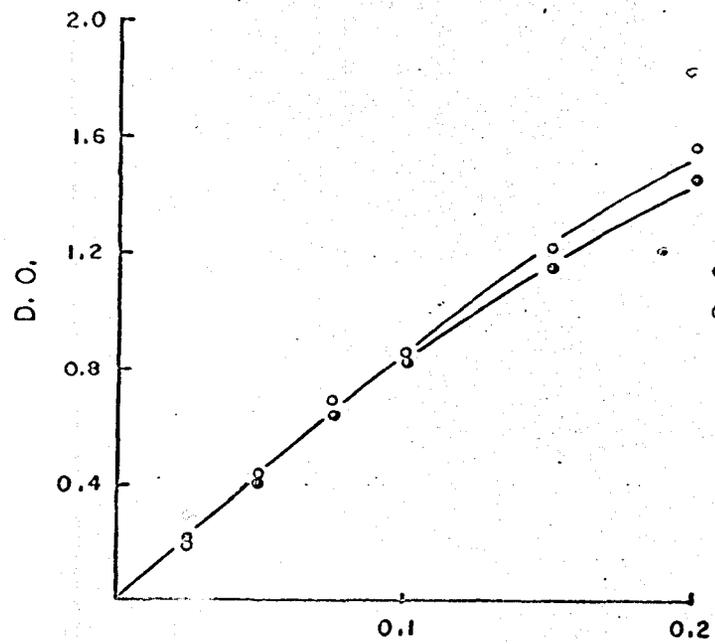
Urea.- Se midió por el método colorimétrico de Kortiz-Cohen, (1954). Una curva de concentración de urea ( Fig. 5 ). muestra una relación directa entre concentración y densidad óptica, a - concentraciones menos de 0.1 umolas. Cuando las lecturas no quedaron en esta zona se repitió el ensayo tomando una alícuota menor.

Citrulina.- Fue también cuantificada por el -- método de Kortiz- Cohen, (1954). En la curva de concentración se ve la relación concentración-densidad óptica ( Fig. 5 ).

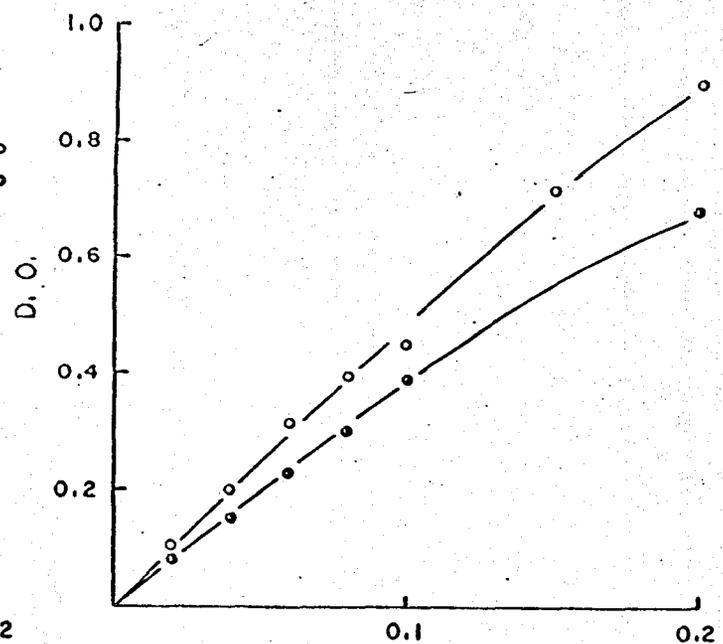
Arginina.- Se determinó siguiendo el método de Sakaguchi, modificado por Van Pilsum, Martín, Kito y Hess (1956 ). En la Fig. 5, se puede ver que a concentraciones menores de 0.1

FIGURA 5.

Determinación colorimétrica de urea, citrulina, arginina e hipuril-L-arginina. Las dos primeras se midieron utilizando el procedimiento de Koritz-Cohen, (1954) y las dos últimas mediante el método de Sakaguchi, modificado por Van Pilsum y cols. (1956).



$\mu$ mol de urea (○) o citrulina (●)



$\mu$  mol de arginina (○) o hipuril-arginina (●)

umola, la densidad óptica es directamente proporcional a la concentración, siendo en esta zona donde se hicieron las lecturas.

Hipuril-L-Arginina.- Se midió con el mismo método utilizado para arginina. La densidad óptica es directamente proporcional a la concentración, como puede verse en la Fig. 5 a concentraciones iguales a la arginina.

Todas las lecturas colorimétricas se hicieron con un colorímetro spectronic 20 Baush & Lomb.

Criterio de pureza del Hipuril-L-arginina.

Antes de utilizar el dipéptido se comprobó que no tuviera arginina y que no fuera hidrolizado por la arginasa, pues de lo contrario traería error en la actividad específica. Para ésto se le agregó a una muestra de dipéptido arginasa purificada, observándose que la cantidad del dipéptido quedaba constante y no había aparición de urea. (Fig. 6).

Fue descartada también la posible contaminación con arginina, por análisis en cromatografía en papel, ya que no se obtuvo ninguna mancha de arginina en las muestras del dipéptido que se corrieron con una mezcla de fenol agua en una relación 4:1.

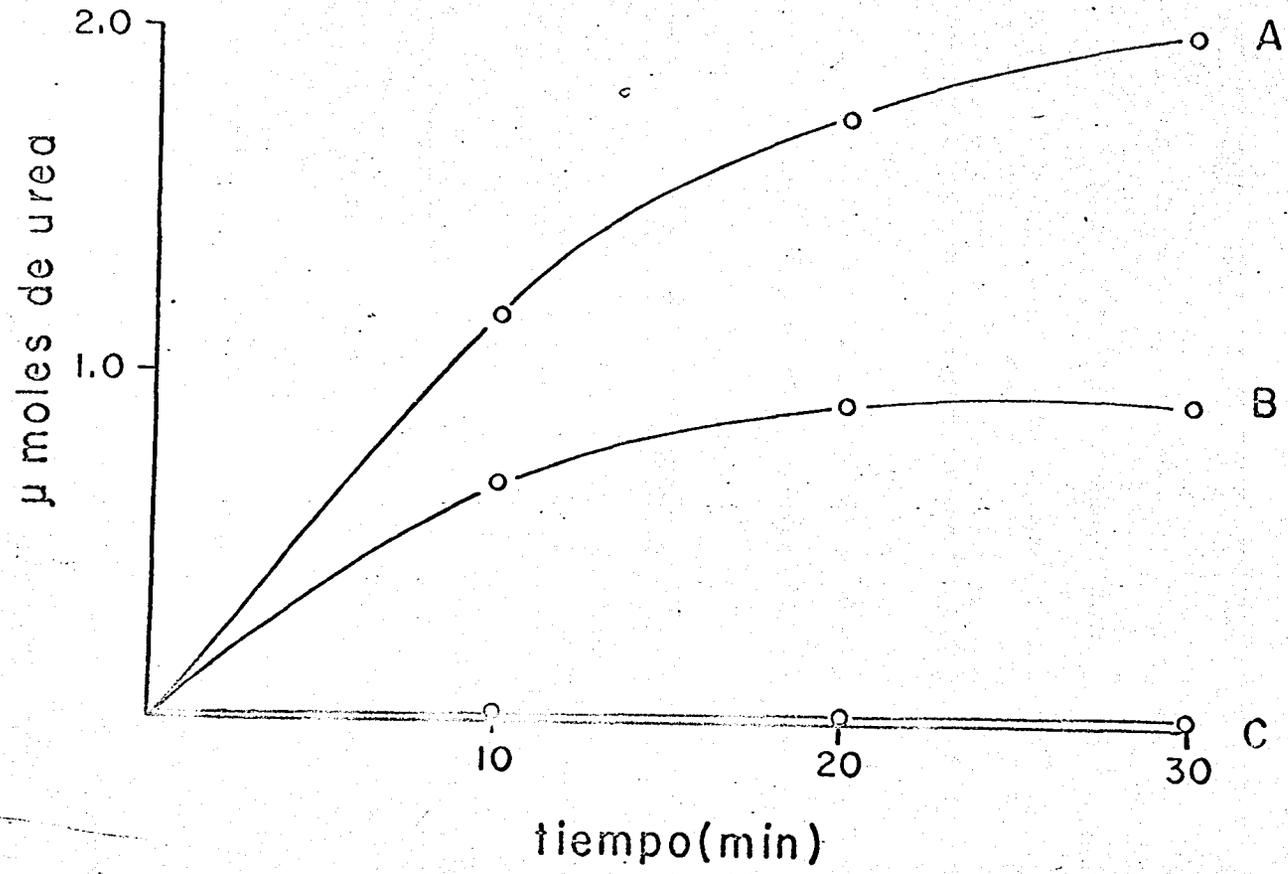
Separación de arginina, urea e hipuril-L-arginina.

Como la radioactividad específica es un dato clave para obtener conclusiones, fue necesaria una separación completa de estos metabolitos, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

FIGURA 6.

Efecto de la arginasa sobre el hipuril-L-arginina.

En un sistema conteniendo 50  $\mu$ molas de amortiguador de fosfatos a pH 7.0, 0.25  $\mu$ molas de  $MnCl_2$  y 1.0 mg. de arginasa purificada se agregó: 2.0  $\mu$ molas de L-arginina (A), 1.0  $\mu$ mola de L-arginina y 1.0  $\mu$ mola de hipuril-L-arginina (B) y 2  $\mu$ molas de hipuril-L-arginina (C). Se incubó a 37° C y se midió urea a los tiempos indicados.



Después de haber incubado el sistema el tiempo correspondiente la reacción fue interrumpida agregando 10.0 ml. de sol. saturada de ácido pícrico. Se centrifugó 10 minutos a 5,000 X g. El sobrenadante se decantó y se pasó por una pequeña columna con resina AG2X8 con objeto de quitar el ácido pícrico.

El eluido se dividió en dos partes para la separación de arginina e hipuril-L-arginina por un lado y urea por otro.

#### Separación de arginina e Hipuril-L-Arginina.

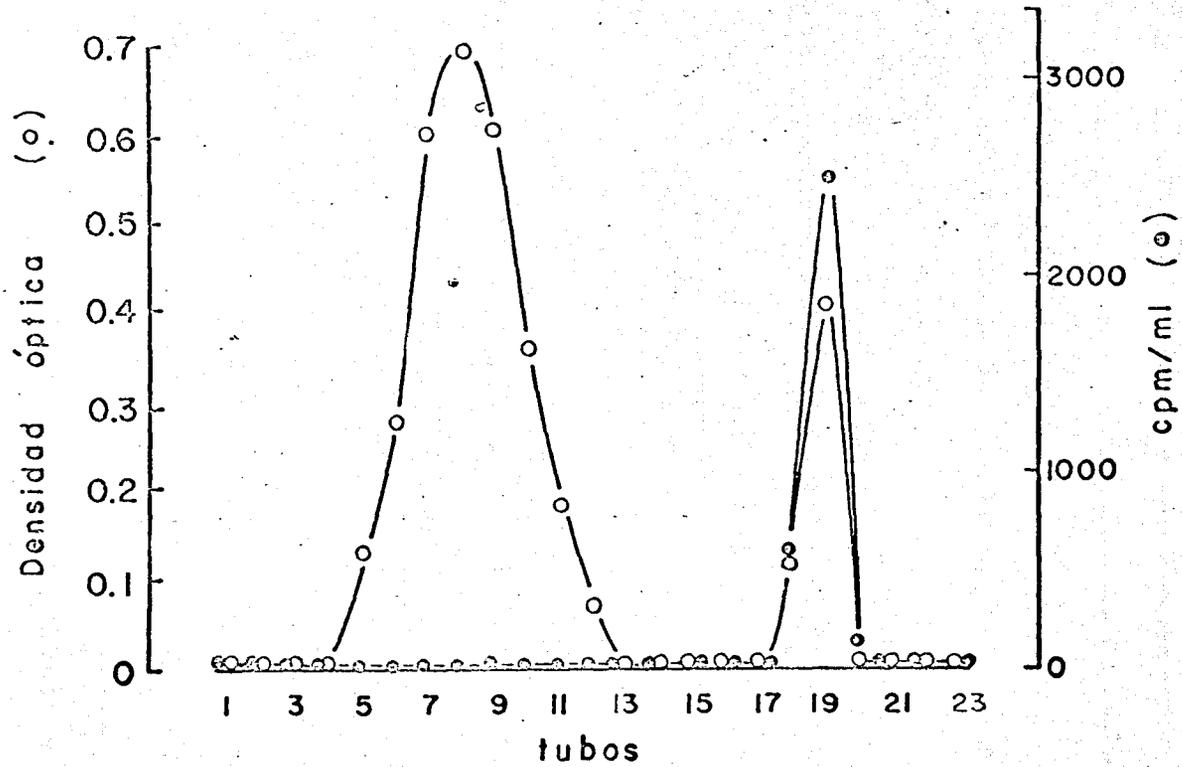
A una de las partes se ajustó a pH 5.0 con NaOH y se pasó a través de una columna con resina Dowex 50X2 previamente equilibrada con solución amortiguadora de citrato de sodio 0.1 M pH 5.0. Inmediatamente después se le fue agregando más solución amortiguadora hasta tener un volúmen de 25.0 ml. En seguida se agregaron 60.0 ml. de NaOH 0.001 N y finalmente 20.0 ml. de NaOH 0.2N, colectándose veintidós fracciones de 5.0 ml. cada una.

La urea y la citrulina se eluyen con la solución de citrato, el dipéptido con la solución de NaOH 0.001 N y la arginina con la solución de NaOH 0.2 N (Fig.7). La urea no fue separada por este método, debido a que sale con ella la citrulina y las dos dan positiva la reacción con el método de Koritz-Cohen.

### FIGURA 7.

Separación cromatográfica de arginina.- Se preparó una solución conteniendo 3.0  $\mu$ molas por ml. de hipuril-L-arginina y 1.0  $\mu$ mola por ml. de L-arginina guanido  $C^{14}$  en amortiguador de citrato de sodio 0.1 M a pH de 5.0. Se pasó 1.0 ml. de esta solución por una columna de resina Dowex 50X2 equilibrada con el mismo amortiguador. La elución se llevó a cabo en la forma indicada en la gráfica. Las fracciones colectadas fueron de 5.0 ml; en cada fracción se determinó el color producido en la reacción de Sakaguchi empleando 0.5 ml. de alícuota y se midió la radioactividad en un contador de plachetas (eficiencia de 16% para  $C^{14}$ ) utilizando 0.2 ml. de alícuota.

# ARGININA



↑ Citato  
pH 5.0

↑ NaOH 0.001 N

↑ NaOH 0.2 N

Con el fin de demostrar que es arginina el pico que sale con la solución más concentrada de NaOH, se pasó por otra columna arginina  $^{14}\text{C}$  marcada en el guanido, observándose que toda la radioactividad sale en este pico. Además, se agregó arginasa purificada, con la consecuente desaparición del color y de la radioactividad. La radioactividad de las fracciones se determinó, tomando una alícuota de 0.2 ml. de cada fracción, las que se colocaron en planchetas y posteriormente fueron leídas en un contador Nuclear Chicago, modelo - 1043.

#### Separación de Urea.-

La segunda parte del eluido de la columna con resina Ag2x8 se le agregó HCl 1.0 N, hasta tener una concentración de 0.1 N.

Se pasó a través de una columna con resina Dowex 50x8 equilibrada en HCl 0.1 N. Inmediatamente se le agregó 9.0 ml. de HCl 0.1 y NaCl 4.0 N en HCl 0.1N hasta colectar 11 fracciones de 3.0 ml. cada una.

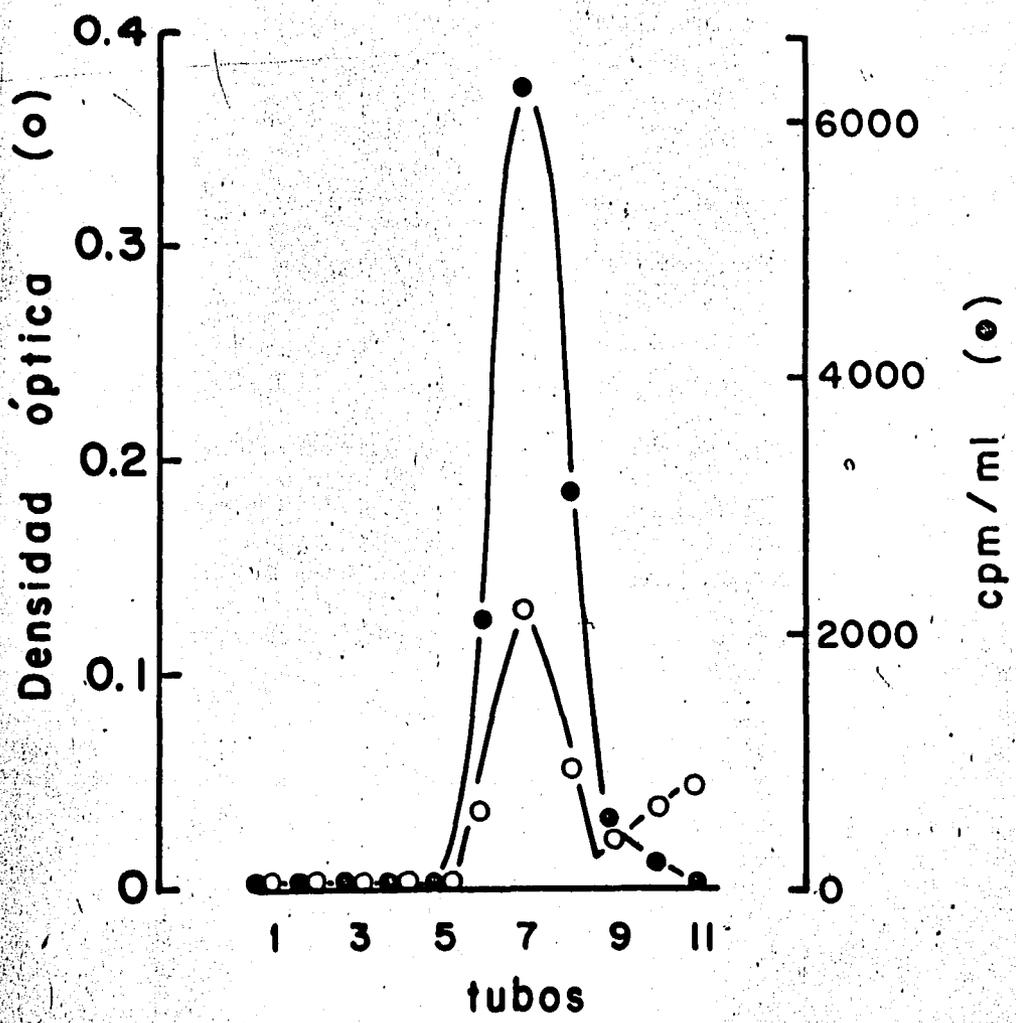
La urea es eluida con el cloruro de sodio permaneciendo unidos a la resina el hipuril-L-arginina, la arginina y la citrulina, aunque en las últimas fracciones empieza a salir citrulina. (Fig. 8).

Con objeto de demostrar si es urea la que se eluye con el cloruro de sodio se pasó por otra columna urea marcada con  $^{14}\text{C}$  y se determinó radioactividad a todas las fracciones con

### FIGURA 8.

Separación cromatográfica de urea. - Se preparó una solución conteniendo 3.0  $\mu$ molas de citrulina por ml. y 1.0  $\mu$ mola por ml. de urea  $C^{14}$  en HCl 0.1N. Se pasó 1.0 ml. de esta solución por una columna de resina Dowex 50 X 8 equilibrada con HCl 0.1N. La elución se llevó a cabo en la forma indicada en la gráfica. Las fracciones colectadas fueron de 3.0 ml; en cada fracción se determinó el color producido en la reacción descrita por Koritz y Cohen empleando 0.25 ml. de alícuota y se midió la radioactividad en un contador de planchetas (eficiencia de 16% para  $C^{14}$ ) empleando 0.2 ml. de alícuota.

# UREA



↑ HCl 0.1N    ↑ NaCl 4.0N en HCl 0.1N

el mismo método utilizado en la separación de arginina y como puede verse en la Fig. 8, el pico de radioactividad corresponde con el de color de urea.

Determinación de la Radioactividad en urea.-

llevándola a  $^{14}\text{CO}_2$ .

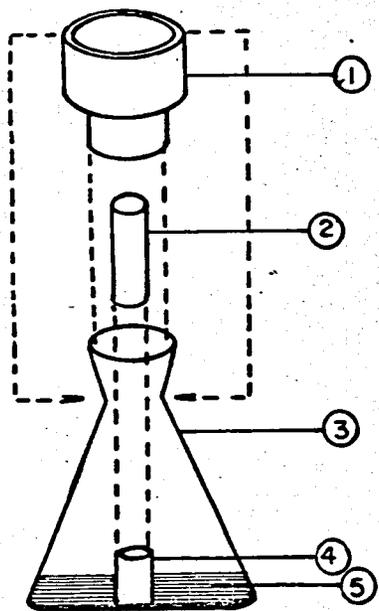
De la fracción que tiene la cantidad más alta de urea (columna Dowex-50x8), se toma una alícuota de 2.0 ml. y se coloca en un frasco especialmente diseñado para cuantificar radioactividad (Fig. 9A).

Se ajusta a pH 5.0 con NaOH y se introduce en el frasco un tubito con 0.2 ml. de hidróxido de hiamina. Se agregan 50 umolas de solución amortiguadora de citrato pH 5.0 y  $\text{H}_2\text{O}$  a tener un volúmen de 3.5 ml. Después se cierra el frasco con un tapón de hule y se inyectan 10 mg. de ureasa purificada en 0.5 ml. de  $\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 9.B).

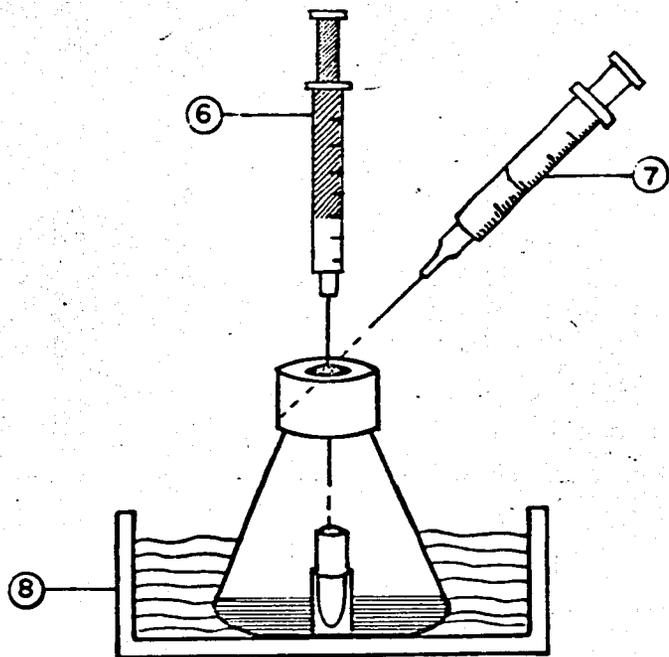
Durante 30 minutos se incuba a  $37^\circ\text{C}$  en un baño con agitación, parándose la reacción con 1.0 ml. de  $\text{HClO}_4$  2.0 M. Se deja el frasco en el baño otros 45 minutos para una mejor fijación del  $\text{CO}_2$  marcado producido en la reacción. Pasado este tiempo se destapa el frasco; se saca el tubito con mucho cuidado y se coloca en un vial que contiene 15.0 ml. de una mezcla para centelleo (4.0 g. de 2,5-difenil oxazol (PPO) y 50 mg. de 1,4 bis 2-(5 fenil oxazolil)beneceno (POPOP) a un litro con tolueno.

## FIGURA 9

Esquema que muestra el dispositivo para la determinación de la radioactividad en urea  $^{14}\text{C}$  y arginina  $^{14}\text{C}$ , llevándolas a  $^{14}\text{CO}_2$ . En A se muestran sus diferentes partes. En B se observa la forma de incubación del sistema y como se inyectaron las enzimas, la hiamina y el ácido perclórico. Tapón de hule de borde plegable (1) tubito de vidrio (2), matraz de 25 ml. (3), tubo soldado al matraz (4), sistema de incubación (5), posición de la jeringa con hiamina (6), posición de la jeringa para inyectar la arginasa, ureasa y el ácido perclórico (7), baño a temperatura constante de  $37^\circ\text{C}$ , con agitación (8).



A



B

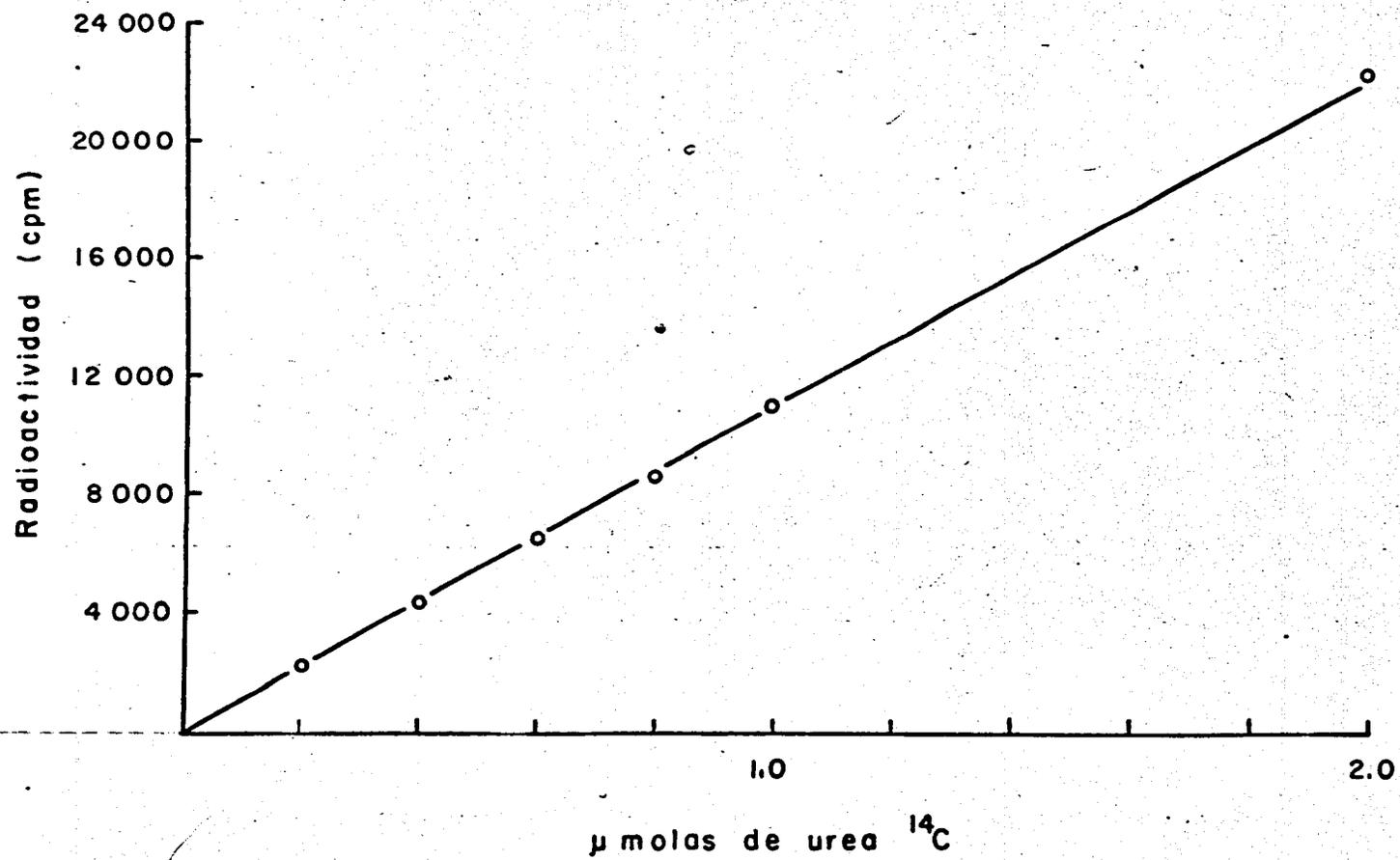
La radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido (Nuclear Chicago, Modelo 4534). Para demostrar que en esta cuantificación no es limitante la capacidad de la hiamina de atrapar  $\text{CO}_2$ , ni la cantidad de ureasa agregada, se hizo una curva de concentración de urea marcada con  $^{14}\text{C}$  manteniendo constantes los demás factores y se obtuvo una relación directa entre radioactividad -- (cpm) y concentración de urea (Fig.10).

#### Determinación de la radioactividad en arginina.

Se toman de la fracción (columna Dowex-50X2) que contiene la concentración mayor de arginina, 20 ml. y se colocan en un frasco con tubito pero sin hidróxido de hiamina. Se ajusta a pH 7.0 con HCl y se agregan 200 umolas de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 más agua, a tener un volúmen de 4.0 ml. Después se ponen 0.5 ml. de una solución que contiene 1.25 mg. de arginasa bovina purificada y 1.5 umolas de  $\text{MnCl}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ . Se tapan los frascos con tapones de hule y se incuban 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en un baño con agitación constante. Al finalizar este tiempo; se inyectan en el tubito 0.3 ml. de hidróxido de hiamina y 10 mg. de ureasa purificada en 0.5 ml. de agua, en el sistema (Fig.9b). Se incuban otros 30 minutos a la misma temperatura. Al finalizar este tiempo se inyecta 1.0 ml. de  $\text{HClO}_4$  2.0 M y se deja en el baño otros 45 minutos. Se sacan los tubitos y se colocan en viales con 15.0 ml. de mezcla para centelleo. Después son leídos en el contador de centelleo líquido.

FIGURA 10.

Recuperación de radioactividad de urea  $^{14}\text{C}$ . En un sistema conteniendo 50  $\mu\text{mol}$  de citrato de sodio a pH 5.0 se agregaron cantidades crecientes de urea  $^{14}\text{C}$  y ureasa purificada en un volúmen final de 4.0 ml., siguiendo la técnica descrita en Material y Métodos.



Purificación de la citrulina ureido  $^{14}\text{C}$ .

En base a experimentos anteriores se había sospechado en una contaminación de la citrulina marcada con urea  $^{14}\text{C}$ . Con la intención de demostrar o descartar esto se le agregó ureasa purificada a una muestra de citrulina marcada y se observó una producción de  $\text{CO}_2$  marcado, comprobándose la presencia de urea, en un 5% aproximadamente. Para separar a los dos metabolitos se pasó una muestra de citrulina radioactiva en  $\text{HCl}$  0.1N a través de una columna con resina Dowex-50X8 previamente equilibrada con  $\text{HCl}$  0.1N. Se agregan inmediatamente 30.0 ml de  $\text{HCl}$  2.0 N y 30.0 ml. de  $\text{HCl}$  4.0N, colectándose 29 fracciones de 2.5 ml. cada una. Se determinó color de urea y de citrulina con el método ya mencionado. La urea se eluye con el  $\text{HCl}$  2.0 N y la citrulina con el  $\text{HCl}$  más concentrado (Fig. 11)(.

Para demostrar que el primer pico corresponde a la urea se trató con ureasa purificada, observándose una desaparición del color con la consecuente aparición de  $\text{CO}_2$  marcado. Al segundo pico también se le agregó ureasa y se demostró que la contaminación con urea era menor al 0.1%. Esta fué la citrulina utilizada en los experimentos.

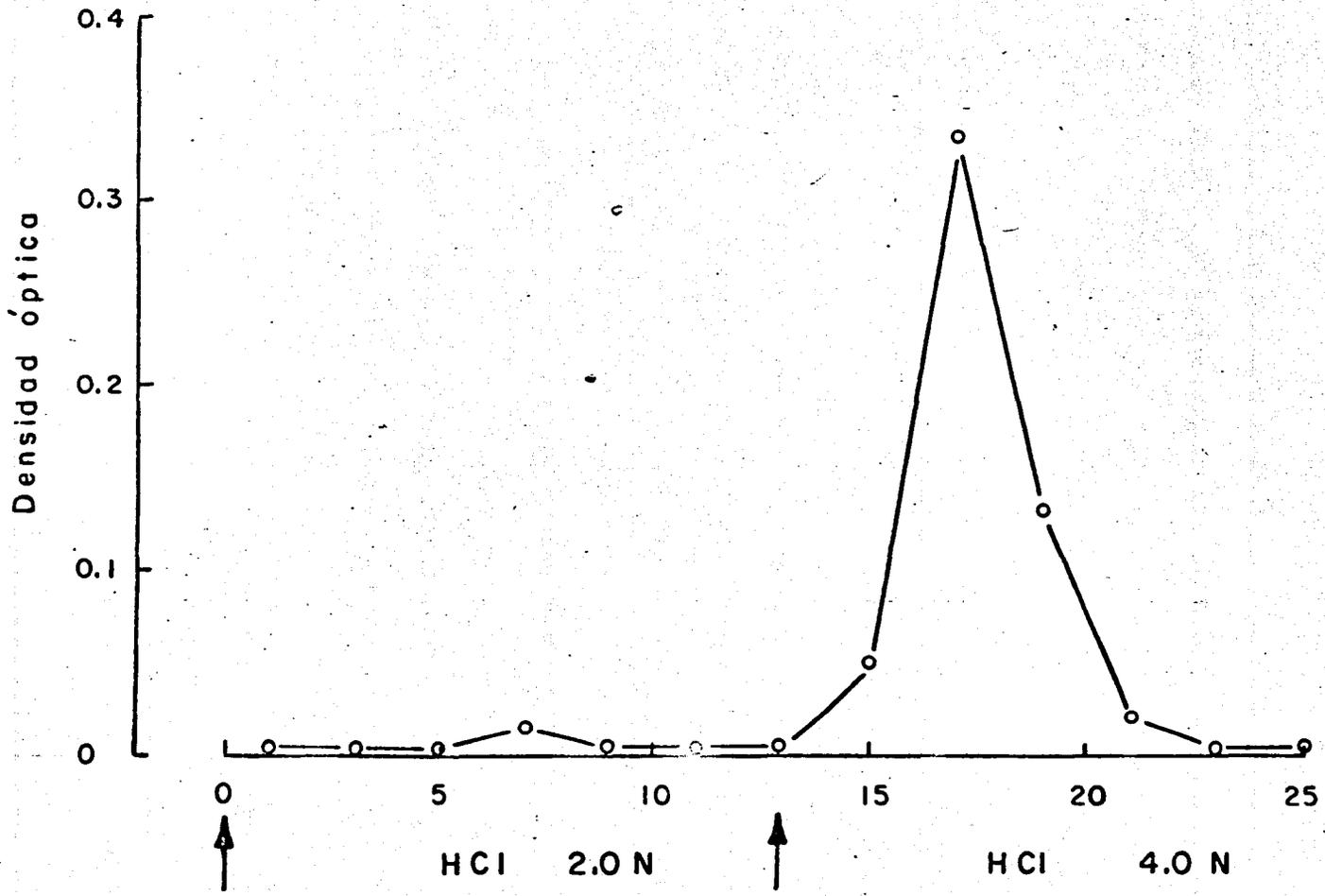
Curvas de recuperación de urea  $^{14}\text{C}$  y arginina guanido  $^{14}\text{C}$ .

Montada la técnica completa, se procedió a estudiar la recuperación de los metabolitos en presencia de todos los -

FIGURA 11.

Separación de la urea  $^{14}\text{C}$  contaminante de la citrulina ureido  $^{14}\text{C}$ .

De una solución de citrulina ureido  $^{14}\text{C}$  en HCl 0.1N con una concentración de 20  $\mu\text{curies/ml}$ . se tomó 1.0 ml. y se pasó por una columna con resina Dowex 50X8 equilibrada con HCl 0.1N. La elución se llevó a cabo en la forma indicada en la gráfica. Se colectaron fracciones de 3.0 ml.; y se determinó color por el método de Koritz-Cohen tomando 0.25 ml. de alícuota de cada fracción.



componentes del sistema de incubación, los cuales se pusieron en las concentraciones utilizadas y cantidades variables de urea y arginina. También se puso ornitina en concentraciones iguales a las de arginina y urea, ya que este aminoácido se va a encontrar siempre en la misma concentración que la urea.

Algunos puntos de la curva se determinaron en presencia del homogeneizado de hígado; en estas determinaciones se agregó la solución saturada de ácido pícrico al sistema antes de añadir el homogenado. Como puede verse en la Fig. 12, la recuperación es lineal y reproducible.

#### Ensayo de la carboxipeptidasa "B".

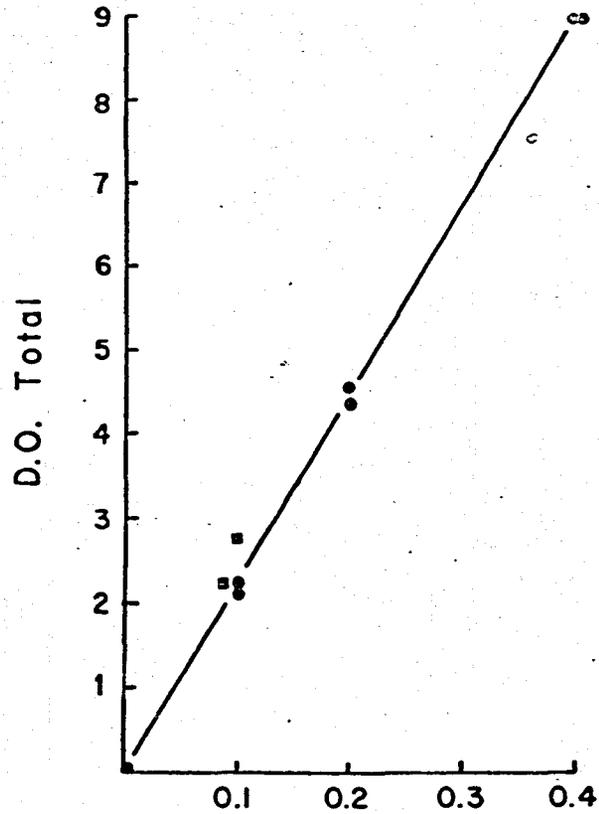
El ensayo de la enzima se hizo en presencia de los componentes del sistema de incubación (a excepción del ATP), y 12.0 umolas del dipéptido Hipuril-L-arginina, en un volumen final de 4.0 ml.

Se midió la actividad de la enzima como la suma de arginina más urea producidas, debido a que en el homogeneizado existe actividad de arginasa. En estas condiciones se observó que la hidrólisis del dipéptido aumenta conforme al tiempo y a la concentración de enzima (Fig.13). De esta manera el flujo exógeno se puede regular aumentando o disminuyendo la concentración de la carboxipeptidasa B. También se estudió el efecto de esta enzima y del dipéptido, sobre la actividad de arginino sintetasa y arginasa encontrándose una inhibición de la arginino sintetasa menor del 15%.

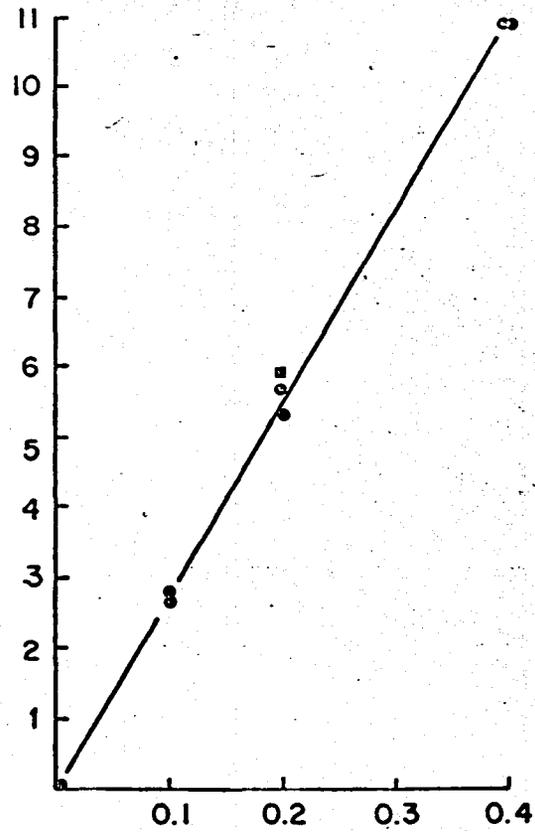
## FIGURA 12.

Curvas de recuperación de arginina y urea en el sistema para medir síntesis e hidrólisis de arginina endógena y exógena.- Se prepararon varios tubos conteniendo todos los componentes del sistema para medir síntesis e hidrólisis de arginina endógena y exógena excepto homogeneizado (●), se les añadieron cantidades equimoleculares de arginina, urea y ornitina a las concentraciones indicadas en la parte inferior de la gráfica en un volumen final de 4.0 ml. A partir de cada tubo se separaron y determinaron arginina y urea en la forma descrita en Material y Métodos. Como D.O. Total se expresa la suma de las densidades ópticas de cada uno de los tubos del pico eluido en la columna correspondiente, haciendo las correcciones necesarias en relación a las alícuotas tomadas. Se presenta también algunos puntos hechos en presencia de homogeneizado utilizando la misma técnica (■).

### UREA



### ARGININA

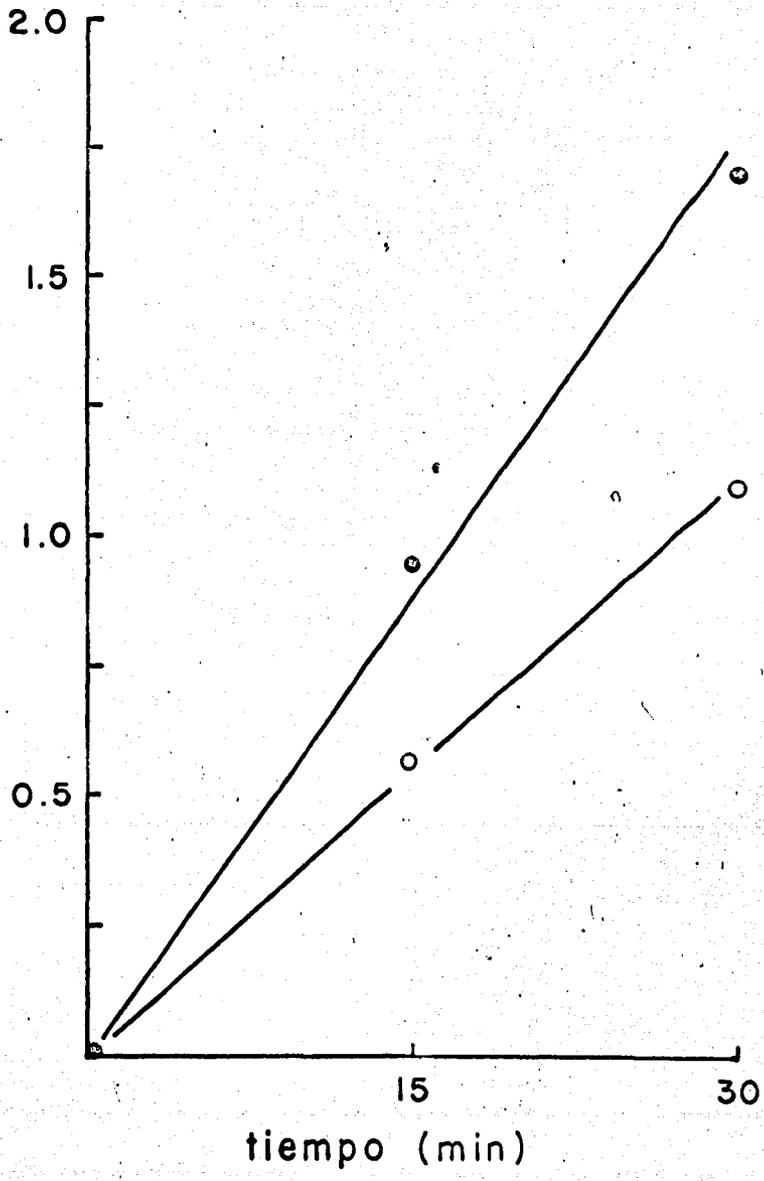


$\mu$  molas / ml.

FIGURA 13.

Hidrólisis de hipuril- L-arginina por carboxipeptidasa B.  
Un sistema igual al utilizado para la síntesis e hidrólisis de arginina endógena sin agregar ATP se incubó a 37°C en presencia de 3.0  $\mu$ moles de hipuril-L-arginina por ml. y 2.0  $\mu$ gramos (○) ó 4.0  $\mu$ gramos (◐) por ml. de carboxipeptidasa B. A los tiempos indicados se midieron arginina y urea en la forma ya descrita.

$\mu$  molas de arginina + urea formadas



CALCULOS.

1.- Radioactividad específica de la arginina.

$$= \frac{(A - B) \quad (1) \quad C}{E \quad \left( \frac{C}{F} \right) \quad \left( \frac{C}{D} \right)}$$

2.- Radioactividad específica de la urea.

$$= \frac{(A - B) \quad (2) \quad C}{G - \left( \frac{(G)(H)}{I} \right) \quad \left( \frac{C}{D} \right)}$$

3.- umolas de urea aportadas por el flujo endógeno en el flujo mixto.

$$= \frac{(J) \quad \left( \frac{I}{G} \right)}{X}$$

4.- umolas de arginina aportadas por el flujo endógeno en el flujo mixto.

$$= \frac{(J) \quad \left( \frac{I}{G} \right)^*}{X}$$

5.- umolas de urea o arginina aportadas por el flujo exógeno en el flujo mixto.

$$= K - L$$

En las ecuaciones anteriores:

A = cpm en alicuota de la fracción con la mayor densidad óptica.

B = cpm en alicuota de la fracción correspondiente al tiempo cero.

C = Volúmen de la fracción con la densidad óptica mayor

D = Volúmen de la alícuota utilizada para determinar radioactividad.

E = umolas de arginina o urea en alícuota de la fracción con mayor densidad óptica.

F = Volúmen de la alícuota utilizada para determinar color.

G = umolas de urea de la fracción con mayor densidad óptica.

$$( G = E \left( \frac{C}{F} \right) )$$

H = La suma de las umolas de urea de todas las fracciones al tiempo cero.

I = La suma de las umolas de urea de todas las fracciones al tiempo correspondiente.

J = cpm de la fracción con mayor densidad óptica de urea.

K = umolas totales de arginina o urea en el flujo mixto.

L = umolas de urea o arginina producidos por el flujo endógeno en el mixto.

X = Radioactividad específica de urea.

(1) Corresponden al conteo de fondo del aparato.

(2) Es cuatro veces el conteo de fondo del aparato. Se debe a una pequeña contaminación de la citrulina ( $^{14}\text{C}$ ) con urea ( $^{14}\text{C}$ ).

\* Se utilizan las mismas expresiones que para urea pero con las magnitudes correspondientes a la arginina.

REACTIVOS.

Los aminoácidos marcados y la tiamina se obtuvieron de Calbiochem (Los Angeles, California, U.S.A.).- La ureasa, arginasa, ATP y la resina Dowex-50-X2-200 de Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo. U.S.A.) El  $H_2SO_4$ , HCl, tolueno, L- naftol, ácido pícrico y  $K_2S_2O_8$  de Baker Analyzed (J.T. Baker Chemical Co. -- Pittsburgh, N.J., U.S.A). El  $Na_2S_2O_3$ ,  $Mg SO_4$ , NaOH, NaCl, --  $MnCl_2$ ,  $HClO_4$ ,  $KH_2PO_4$  de Merck (E. Merck A.G. Darmstadt, Germany).

La carboxipeptidasa "B" y el dipéptido Hipuril L-arginina de Mann Research Laboratories (Dickinson & Co., N.Y., N.Y., U.S.A. ). El hidróxido de tiamina, el POP<sup>5</sup> y el POPOP de Amersham, Searle Corporation (Illinois, U.S.A.). La 2,3 butanediona monoxima y el ácido p-difenilsulfónico (Sal. de sodio) de Eastman Organic Chemicals (Rochester, N.Y., U.S.A.) La resina AGZ-X8 y la Dowex-50X8 de Bio-Rad Laboratories (Richmond, Calif, U.S.A).

## RESULTADOS.

Con el sistema de síntesis e hidrólisis de arginina, descrito anteriormente, se llevó a cabo un experimento, con el fin de medir la capacidad de la arginasa para hidrolizar arginina endógena y exógena.

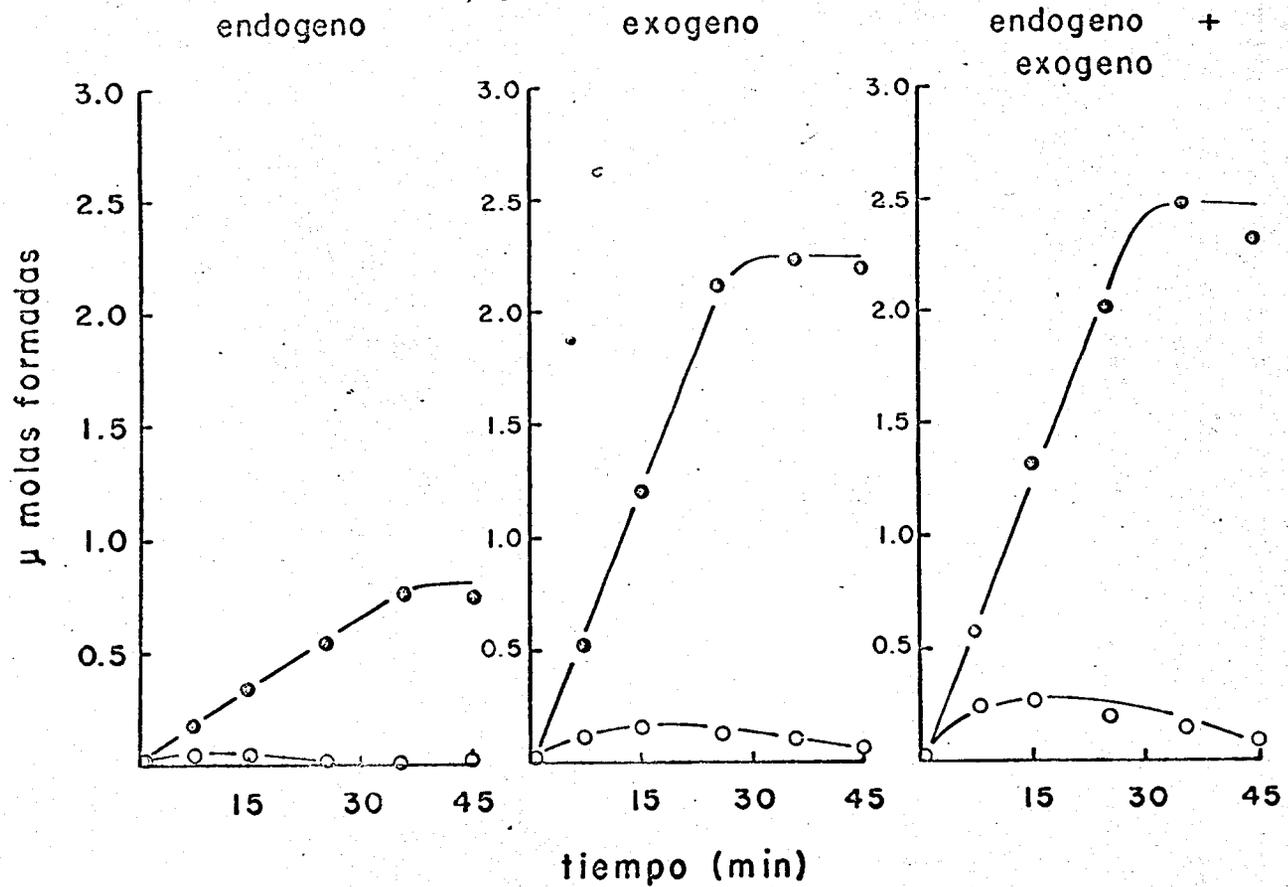
Se ensayó el sistema de incubación en ausencia de carboxipeptidasa y de Hipuril-L-arginina y en presencia de todos los componentes omitiendo ATP a fin de establecer los flujos exógeno y endógeno, respectivamente. Previamente se demostró que el sistema de producción endógena no funciona en ausencia de ATP.

De esta manera se tienen por un lado la formación e hidrólisis de arginina producida a partir de aspartato y citrulina como puede apreciarse en la parte izquierda de la figura 14, donde toda la arginina producida es endógena. Como se ve la cantidad de urea formada es mucho mayor la cantidad de arginina acumulada, es decir, este aminoácido está siendo fácilmente hidrolizado. A tiempos cortos la producción de urea es lineal y alrededor de los 35 minutos decrece el flujo.

La arginina, en un tiempo menor de 15 minutos no es hidrolizada totalmente, quedando una pequeña cantidad, pero a partir de este tiempo es completamente hidrolizada. Al centro de la figura 14 se muestra la producción de urea y arginina a partir del

#### FIGURA 14.

Síntesis e hidrólisis de arginina; formada a partir de citrulina, ácido aspártico y ATP (endógeno), a partir de hipuril arginina (exógena) y a partir de ambas fuentes simultáneas (endógeno + exógeno). - El sistema de incubación se encuentra descrito en Material y Métodos; para obtener el flujo endógeno separado se omitieron del sistema el hipuril-L-arginina y la carboxipeptidasa B, para obtener el flujo exógeno separado se omitió el ATP. Los sistemas así formados se incubaron a 37°C; a los tiempos indicados se midió la cantidad de arginina (o) y urea (o) formadas por ml de sistema. Ver Material y Métodos para la separación cromatográfica y determinación colorimétrica de arginina y urea.



dipéptido y carboxipeptidasa, o sea el flujo exógeno. La cantidad de urea es mayor que la de arginina, sin embargo a los 45 minutos todavía hay arginina. El flujo empieza a disminuir a los 25 minutos de incubación.

El resultado obtenido cuando estuvieron en el mismo sistema los dos flujos se ve en la parte derecha de la Fig.14 donde se observa una cinética más parecida a la del flujo exógeno. Es de notarse una libre inhibición del flujo endógeno, ya que la suma de los dos flujos, valorados separadamente no es igual al flujo mixto. Esto se debe a que la carboxipeptidasa inhibe algo el sistema de síntesis de arginina.

Para saber si hubo o no preferencia de hidrólisis de la arginina endógena es necesario cuantificar las contribuciones del flujo endógeno y del exógeno a la urea formada. Para obtener este dato según se indicó anteriormente se utilizó la actividad específica de la arginina y de la urea, obtenida en el flujo endógeno y las cpm totales determinadas en el flujo mixto; de esta forma se obtuvieron las umolas de arginina y urea formadas a partir de citrulina en cada tiempo. La cantidad del flujo exógeno es la diferencia entre el total menos el endógeno. De esta forma tenemos (fig.15) Las cantidades de arginina y urea que aportó cada flujo cuando estuvieron juntos.

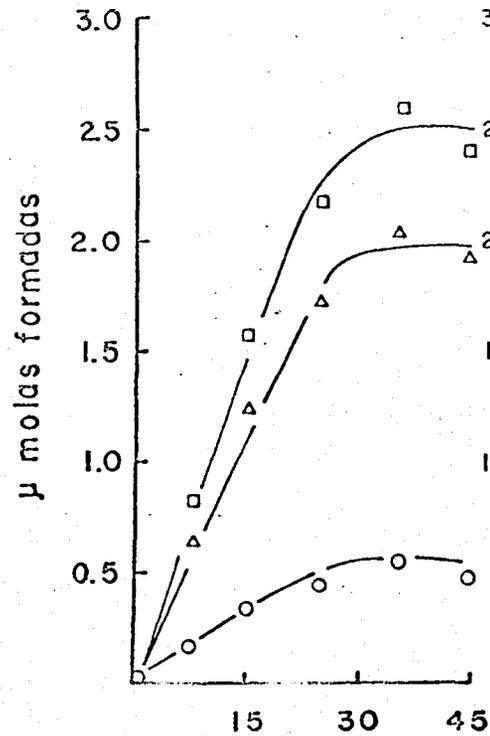
A la derecha de la figura 15 se observan los flujos en forma total, o sea la suma de arginina más urea. El flujo --

FIGURA 15.

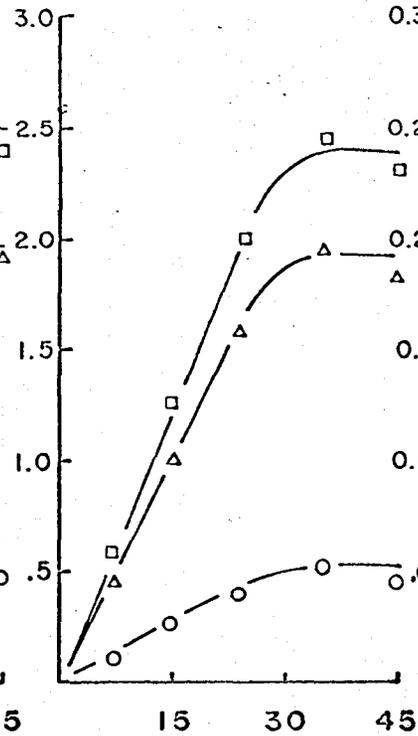
Determinación de la cantidad de arginina y urea producidas a partir de la fuente endógena (o), exógena (Δ) y endógena + exógena (□) cuando ambas fuentes se encuentran presentes simultáneamente en el sistema. Los datos se obtuvieron del mismo experimento presentado en la figura 14, tomando únicamente el sistema en que ambos flujos de arginina funcionaron simultáneamente. Para obtener la cantidad de urea y arginina producida por la fuente endógena se tomó en cuenta la cantidad total de arginina y de urea, la radioactividad total de ambos metabolitos y la radioactividad específica de la citrulina empleada\*. La cantidad de urea y arginina producida por la fuente exógena se obtuvo restando la cantidad obtenida para el flujo endógeno de la cantidad total (ver calculos).

\* Cuando el flujo endógeno funcionó separado del exógeno la radioactividad específica de la citrulina empleada y de la urea y arginina formadas fue la misma.

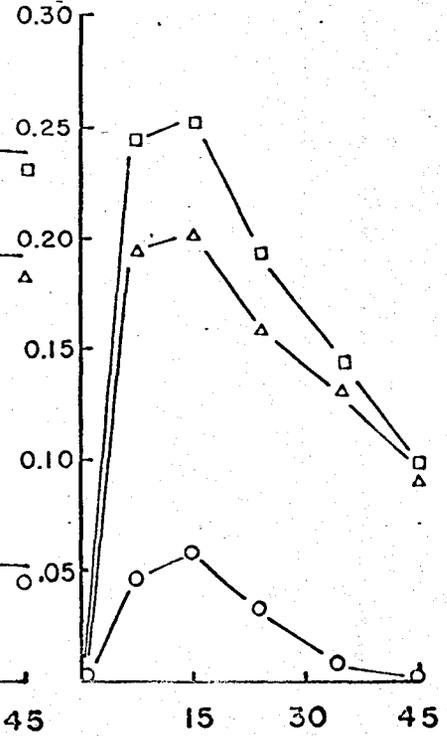
UREA + ARGININA



UREA



ARGININA



tiempo (min)

exógeno es cuatro veces mayor que el endógeno y ambos empiezan a decrecer a los 25 minutos.

La cantidad de urea que produjo cada flujo se observa en el centro de la Fig. 15, donde se ve la semejanza entre ésta y la gráfica del flujo total, debido a que la cantidad de urea es muy grande en relación a la de arginina por lo que al restar la cantidad de arginina prácticamente no se modifica esta cantidad. De esto resulta claro que la diferencia en la hidrólisis de arginina no pueden ser aparentes en esta forma. Se ve también que es lineal la producción de urea hasta los 25 minutos disminuyendo a partir de este tiempo.

A la derecha se muestra la cantidad de arginina que aporta cada flujo y la forma en que fue hidrolizada en función del tiempo; se observa que en tiempos menos de 25 minutos, la cantidad de arginina endógena y exógena está siendo sintetizada e hidrolizada en forma parecida, pero a partir de este tiempo empieza a aumentar la hidrólisis de la arginina endógena, perdiéndose la relación de hidrólisis que había en los primeros minutos. Que la arginina endógena se hidroliza más se aprecia fácilmente pues a los 45 minutos casi toda la arginina que queda es exógena.

Estos datos pueden verse en otra forma (tabla : ) donde la cantidad de arginina endógena hidrolizada es mayor a partir del minuto 25, conservándose una relación de flujos constan-

TABLA I.

Hidrólisis de arginina endógena y exógena.

En cada tiempo se señala en terminos porcentuales tanto la contribución de arginina endógena (I) y de arginina - exógena (II) como la proporción de cada tipo de arginina que no es hidrolizada. La radioactividad específica se expresa como cpm por  $\mu$ mola de urea o arginina

Tiempo (min)	Arginina producida		Arginina no hidrolizada		Radioactividad especifica	
	% de I	% de II	% de I	% de II	UREA	ARGININA
7.5	18	82	20	80	5150	5500
15	20	80	23	77	6100	6650
25	20	80	18	82	5790	5150
35	20	80	8	92	6300	2300
45	20	80	3	97	5950	1050

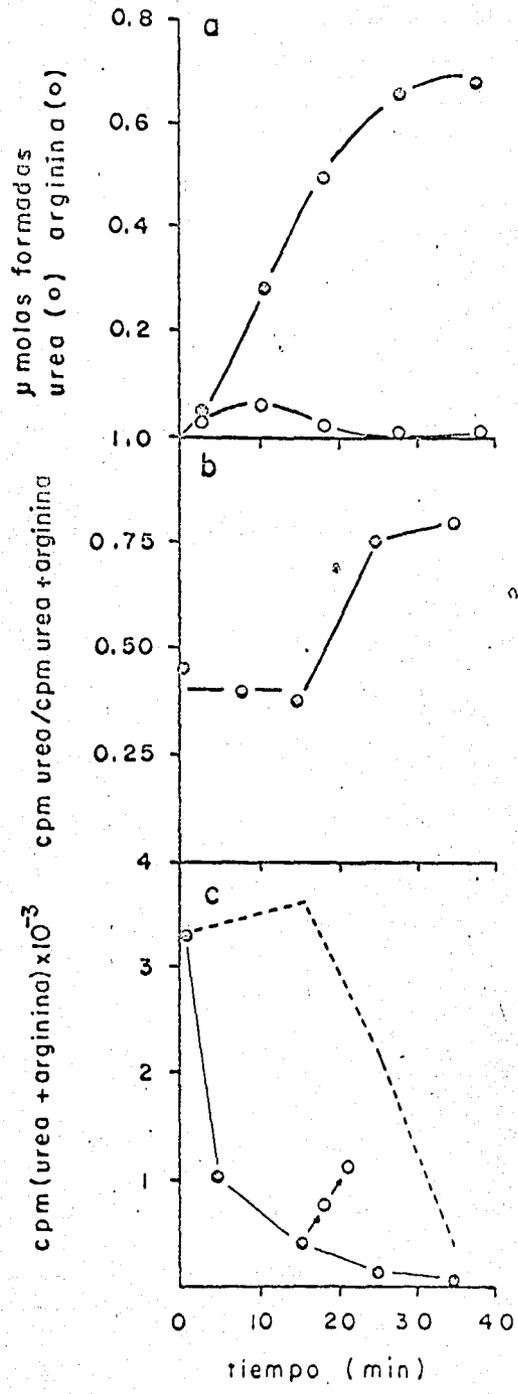
te; por lo que, consecuentemente la actividad específica de la arginina va disminuyendo, siendo a los 45 minutos aproximadamente 5 veces menor.

Dada la disminución de la actividad específica de la arginina era de esperarse un aumento en la actividad específica de la urea, que no se observa en la tabla. Ello se debe a la gran cantidad de urea acumulados en relación a la de arginina, siendo así difícil de notar un cambio en actividad específica de la urea.

La disminución de la actividad específica de la arginina se observa solamente en los últimos tiempos, lo cual parece indicar que la capacidad de la arginasa para hidrolizar arginina endógena aumenta con el tiempo. Con objeto de probar directamente si la capacidad de hidrólisis de la arginasa se incrementa con el tiempo, se diseñó un experimento consistente en estudiar la conversión de citrulina en arginina y urea iniciando la incubación con citrulina fría y agregando en distintos tubos pulsos de citrulina marcada con  $^{14}\text{C}$  en el grupo ureído a diferentes tiempos, midiendo la incorporación de radioactividad en arginina y urea, 3 minutos después de añadir el pulso. Los datos obtenidos se muestran en la figura 16, donde se observa que a partir del minuto 18 aumenta la relación de cpm de urea/cpm de arginina y lo que coincide con un aumento en la hidrólisis de la arginina endógena acumulada.

FIGURA 16.

Capacidad del homogeneizado de hígado de rata de hidrólizar arginina endógena en el sistema ya descrito. Se inició la reacción con citrulina fría y en cada tiempo se agregó un pulso de citrulina ureido  $^{14}\text{C}$  (44,000 cpm) se dejó incubar 3 minutos mas y se midió la cantidad de urea (○) y arginina (○) formadas (a), así como la radioactividad incorporada en urea y en arginina (b). En (c) se muestra la incorporación de radioactividad en urea + arginina (○) la radioactividad incorporada calculada (ver texto) y los cpm obtenidos a un tiempo de incubación, pero incubados con el pulso 6 y 9 minutos (○).



En este experimento se puede calcular la cantidad de cpm de arginina más urea que debería obtenerse en cada uno de los tiempos, teniendo en cuenta la actividad específica de la citrulina en cada tiempo y la cantidad de urea y arginina producidos en cada intervalo de 3 minutos.

Como puede observarse (Fig.16) la radioactividad incorporada en urea y arginina es menor que la esperada. No obstante cuando el tiempo de incubación después del pulso de citrulina marcada es mayor de 3 minutos, aumenta la incorporación de la marca en urea + arginina

Los experimentos anteriores indicaron que aumenta con el tiempo la capacidad de la arginasa de hidrolizar la arginina endógena, lo cual podría deberse a la presencia de alguno(s) de los componente(s) durante la incubación, por lo que se estudió el sistema de producción de arginina endógena, preincubándolo 25 minutos con los componentes del sistema omitiendo uno a la vez la incubación del sistema completo, se prolongó la incubación durante 20 minutos. Se razonó que habría una hidrólisis completa de la arginina desde los primeros minutos en el caso de que algún componente fuera responsable de interaccionarse con la arginasa y así aumentar su capacidad de hidrólisis. Cuando se preincubaron los sistemas sin aspartato o sin citrulina y se inició la reacción al tiempo cero, con cada uno de ellos no se encontraron cantidades apreciables de arginina y urea (Tabla 2).

TABLA 2.

EFFECTO DE LA PREINCUBACION SOBRE EL SISTEMA DE FORMACION DE ARGININA.

SISTEMA.	ACTIVIDAD DE ARGININO SINTETASA ( % ) *
1.- Completo	100
2.- Sin ATP	85
3.- Sin acido aspártico	20
4.- Sin citrulina	10
5.- Sin Mg ++	50

Los tubos se preincubaron 25 min. a excepción del 1 y la reacción se inició agregando el componente omitido.

\* Se expresa como la suma de urea y arginina durante los 20 minutos de incubación.

En el caso del sistema preincubado sin  $Mg^{++}$  se obtuvo una producción de arginina y urea de aproximadamente la mitad del control (sin preincubar). Cuando el sistema fue preincubado sin ATP e iniciado al añadir este compuesto la producción del sistema fue muy similar al control;

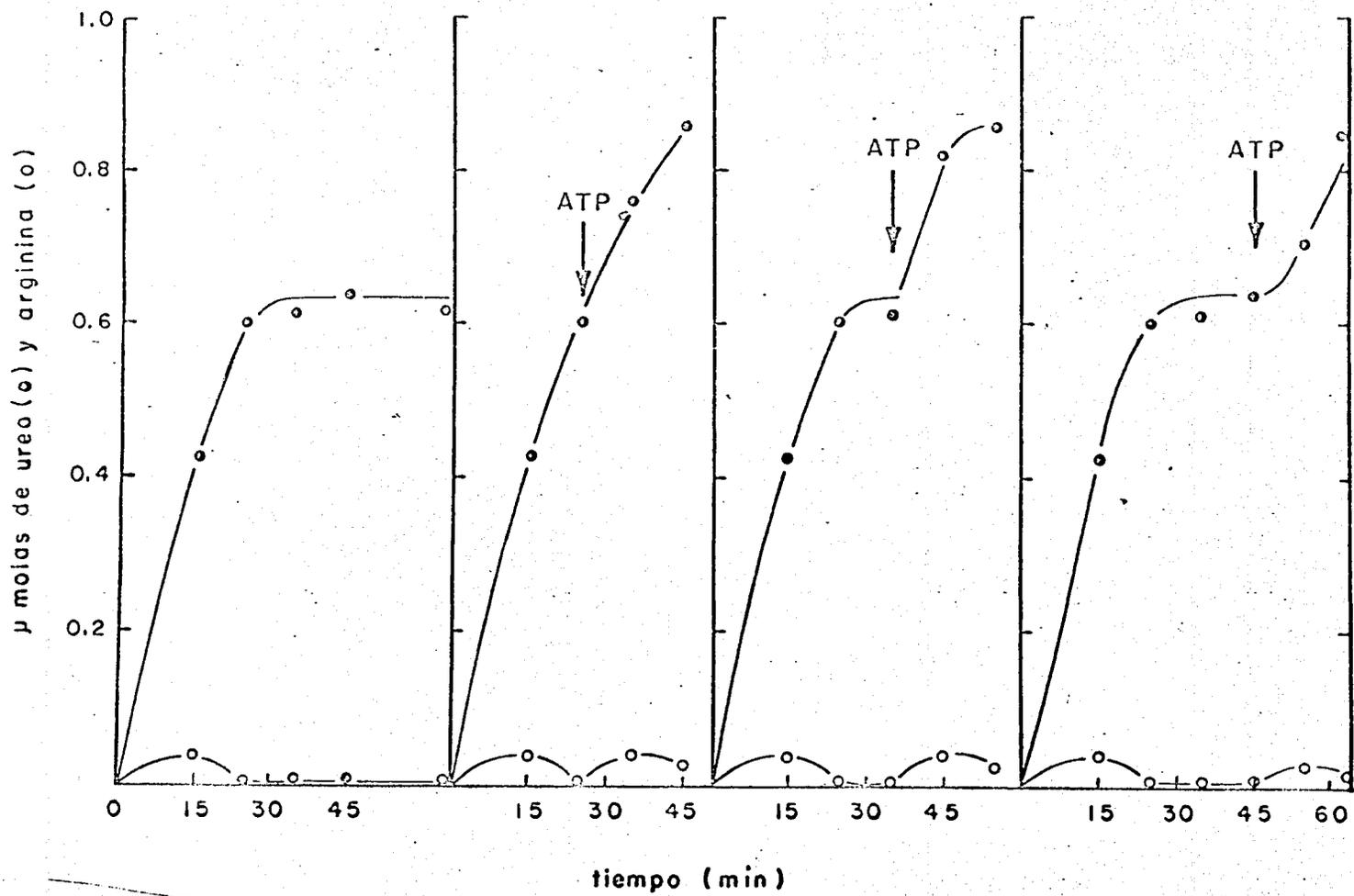
Esto indicaba que durante la incubación, de alguna forma se estaba perdiendo ATP, probablemente por hidrólisis por ATPasas que se presentan en el homogeneizado, pues cuando se preincubó sin ATP el sistema trabajó normalmente, el caso del  $Mg^{++}$  se explica por el hecho de que es un activador de estas enzimas y así cuando se preincubó en ausencia del catión no se degradó todo el ATP y el sistema funcionó en un 50%.

Esta observación sugería que el flujo endógeno disminuye por falta de ATP, por lo que se estudió el efecto de 5  $\mu$ molas de ATP agregadas a diferentes tiempos después de iniciada la incubación, cuando el flujo es lineal, cuando empieza a disminuir cuando ha llegado a una meseta. Los resultados muestran que en todos los casos el ATP aumenta el flujo, principalmente cuando todavía es lineal. También se observa que cada vez que se añade el ATP se acumula arginina ( Fig. 17 ).

El hecho de que se acumule arginina en un tiempo donde había sido totalmente hidrolizada la arginina en el control, sugirió una posible inhibición de la arginasa por el ATP a las concentraciones iniciales, lo cual explicaría la acumulación de arginina a

FIGURA 17.

Efecto del ATP sobre el sistema de síntesis e hidrólisis de arginina endógena. Se prepararon varios tubos conteniendo todos los componentes del sistema endógeno y a diferentes tiempos de iniciada la reacción se agregaron 5  $\mu$ moles de ATP, se incubaron a 37°C con agitación 10 y 20 minutos más. En cada tiempo se midió la cantidad de urea (●) y arginina (○) producida en la forma descrita en Material y Métodos.



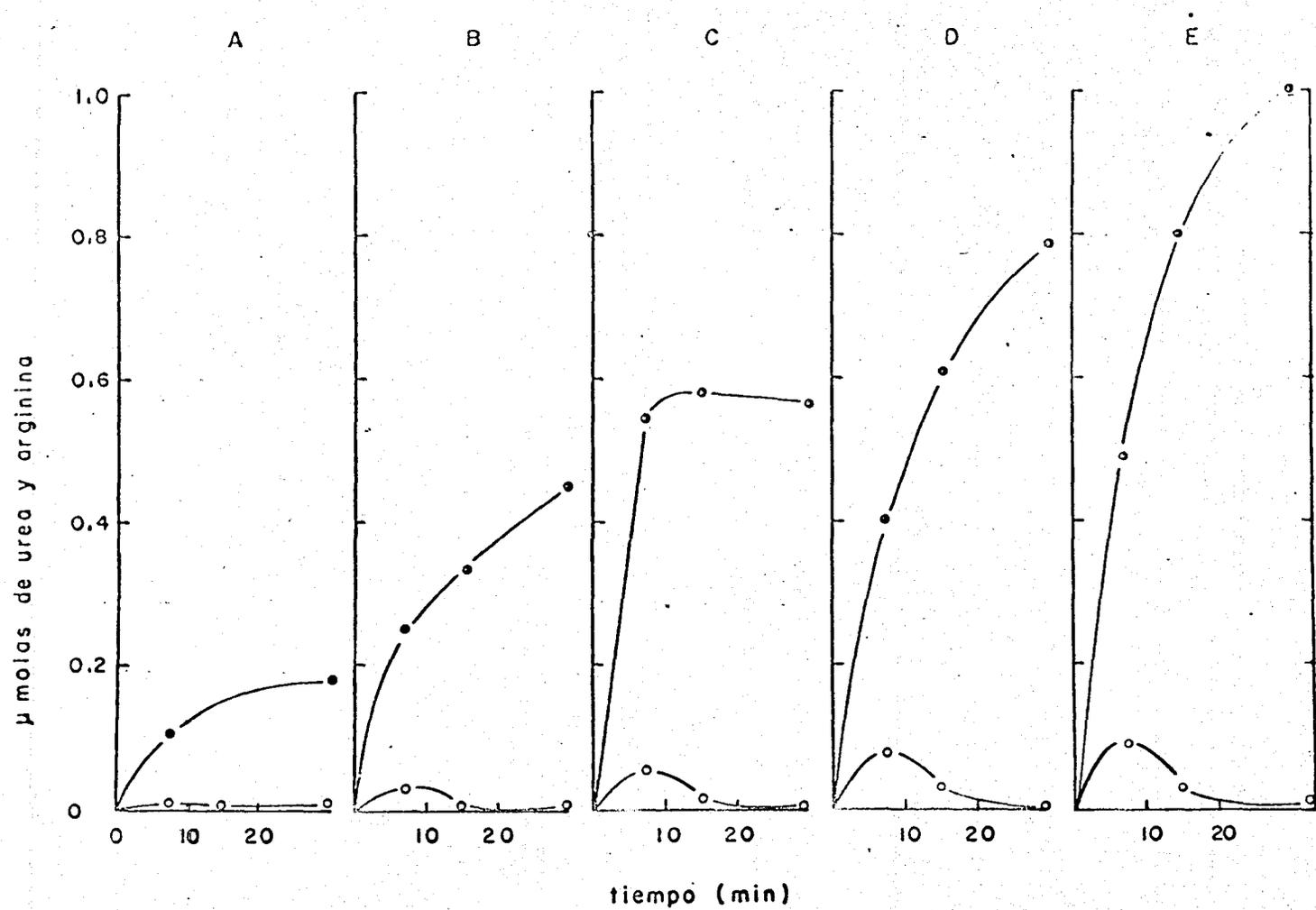
tiempos cortos y, después de ser hidrolizado el ATP disminuiría la inhibición y la arginina sería más fácilmente hidrolizada.

Si este fuera el caso habría una concentración de ATP por debajo de la cual no se observaría ningún efecto sobre la arginasa. Para demostrar esto se hizo un experimento en el cual se pusieron diferentes concentraciones de ATP en el sistema, esperando encontrar una concentración que diera como resultado que no hubiera acumulación de arginina desde un principio. Los resultados muestran una acumulación de arginina en todos los casos similar a la encontrada con la concentración mayor variando solamente en la cantidad acumulada (Fig.18).

### FIGURA 18.

Efecto de la concentración de ATP sobre el sistema de síntesis e hidrólisis de arginina endógena. Se prepararon varios tubos conteniendo los componentes del sistema en la concentración indicada anteriormente a excepción del - ATP, cuya concentración se varió como sigue: 1.0  $\mu$ mola (A) 2.0  $\mu$ molas (B), 3.0  $\mu$ molas (C) , 4.0  $\mu$ molas (D), 5.0  $\mu$ molas (E).

La reacción se inició con el homogeneizado y se incubó a 37°C con agitación los tiempos señalados en la abscisa. Otra indicaciones son los mismos que en la figura 17.



## DISCUSION.

Se ha postulado que las enzimas que forman el ciclo de la urea se encuentran integradas físicamente (Soberón, Ortiz-Pineda y Tarrab, 1967; Soberón, Tarrab y Palacios, 1960). Los datos en que esta apoyado este postulado son los siguientes:

a) Las pozas metabólicas de arginina y ornitina son mas bajas en el hígado de los animales ureotelicos que en los uricotóxicos (Kaplan y Schimizu, 1962).

b) La arginina es un aminoácido esencial en la rata (Broman y cols, 1946) y en el hombre se ha demostrado que el aminoácido se requiere para un crecimiento óptimo de los niños (Holt, y cols, 1960).

c) La administración de citrulina marcada a la rata se incorpora como arginina marcada en las proteínas del riñon pero no en las proteínas del hígado (Rogers y Fredland, 1968).

d) En homogeneizados de hígado de ajolote mexicano (Ambystoma mexicanum) se ha encontrado que la actividad y la estabilidad de la arginasa no se relacionan directamente en su capacidad de hidrolizar arginina endógena. En efecto a concentraciones de  $Co^{++}$  y  $Ni^{++}$  que dan la misma actividad y estabilidad hidrolizan en forma diferente a la arginina endógena. Con  $Co^{++}$  hay una hidrólisis de arginina endógena del 90% mientras que con  $Ni^{++}$  solamente

es del 30% siendo igual la actividad y estabilidad (Palacios, Huitrón y Soberón, 1969). Esto sugiere la formación de diferentes tipos de complejos de metal-enzima, igualmente activas y estables que sin embargo, no tienen la conformación adecuada para unirse con las enzimas que forman arginina.

e) El hecho de encontrarse todas las enzimas responsables de la biosíntesis de arginina más arginasa no significa que el ciclo de la urea funcione como tal (Mora y cols, 1965). A este respecto cabe mencionar que se ha reportado una amplia gama de arginasas, donde resulta muy interesante el estudio de la relación entre las características de la molécula con su capacidad de integración al ciclo.

El presente trabajo se llevó a cabo con la intención de obtener mayor evidencia sobre la integración de la arginasa con las enzimas que forman arginina.

Los resultados obtenidos demuestran una hidrólisis preferente de la arginina endógena sobre una arginina producida "artificialmente" en el sistema lo cual ha sido interpretado en el sentido que la arginina biosintetizada a partir de citrulina es más accesible a la acción de la arginasa.

La hidrólisis preferente puede ser explicada de la siguiente forma:

a) Que la arginina producida endógenamente -

sea diferente a la producida por el dipeptido.

b) Que hubo una disminución del flujo endógeno anterior al del exógeno.

c) La integración física la arginasa con el sistema de producción de arginina (Arginino succinico sintetasa y Arginino succinasa).

Sobre la primera posibilidad se ha demostrado que tanto la arginina producida por la fuente endógena como la producida a partir del dipeptido cromatografían igual. Además aisladas del sistema de incubación ambas son hidrolizadas por arginasa produciendo urea y ornitina.

En relación al inciso b, se observa en la tabla 1 que la relación de velocidad de los dos flujos permaneciendo constante durante todo el tiempo de incubación. No obstante, cabría la posibilidad que el método para determinar la cantidad de urea y arginina no sea lo suficientemente sensible para detectar las diferencias en la velocidad de los flujos, lo cual traería como consecuencia la disminución de la radioactividad específica de la arginina.

Favorecemos la interpretación de la integración física de la arginasa para explicar la hidrólisis preferente.

Dicha preferencia resulta de una mayor concentración de arginina endógena cerca del sitio activo de la arginasa.

Hay que recordar que el Km de la arginasa de la rata es de  $5 \times 10$

$^{-3}$  M y en el sistema experimental se encuentran concentraciones

menores de  $5 \times 10^{-4}$  M, rango de concentración en el que cualquier aumento en la cantidad de arginina se acompaña de un aumento en la velocidad de la reacción.

Sobre el particular es de notarse que casi toda la arginina producida es hidrolizada, lo cual sugiere un exceso de arginasa.

La hidrólisis preferente se refleja en una disminución de la radioactividad específica de la arginina. Cabe preguntar porque la actividad específica baja a partir del minuto 25 y no desde el tiempo cero. Se penso que esta situación era debido a un aumento en la capacidad de la arginasa para hidrolizar arginina, causada por la interacción con algunos de los componentes del sistema en las condiciones utilizadas. No se encontró el responsable directo del aumento de esta capacidad. Así la disminución de la actividad específica de la arginina a partir de la incubación del minuto 25 requiere mayor estudio; por lo pronto es necesario llevar a cabo el experimento con los dos flujos juntos pero con una actividad menor de arginasa, condición en la que debe hacerse más aparante la hidrólisis preferente.

Respecto de la acumulación de la arginina (fig. 17) que resulta al añadir ATP se descartó un posible efecto inhibitorio sobre la arginasa y pudiera ser explicado también como un rebo-samiento por arginina del sitio donde esta siendo hidrolizada.

En relación al agregado multienzimático es impor-

tante recordar que la distribución de las enzimas que sintetizan urea, obtenida por estudios de centrifugación diferencial no apoyan el agregado multienzimático, ya que se obtiene la siguiente localización: la carbamil fosfato sintetasa y la ornitina transcarbamilasa en mitocondria, la arginina succínico sintetasa y la arginino succinasa en sobrenadante y la arginasa en microsomas, núcleo y mitocondrias. (Cohen y Hayano, 1948; Mora y cols, 1965). Sin embargo es necesario revisar más detenidamente estos datos pues se han reportado casos en que las enzimas salen del lugar en que se encuentra originalmente. En efecto, ha sido reportado un escape de enzimas mitocondriales que puede ser impedido por la presencia de ciertos fosfolípidos. (Estrada, Carabez y Cabeza, 1966). También se ha encontrado que el uso de solventes orgánicos en estudios de centrifugación diferencial permite retener en el núcleo algunas enzimas que participan en la biosíntesis de ácidos nucleicos (Alfrey, 1959).

Por otro lado es importante tener en cuenta la gran organización estructural de la célula puesta de manifiesto con el microscopio electrónico y con otros métodos con que se cuenta en la actualidad.

Con ésto, se ha establecido la idea de que la célula no es una solución de moléculas que interaccionan al azar - sino todo lo contrario, la célula tiene varios niveles de organización, que van en un orden de complejidad creciente como son: molecular, macromolecular, supramacromolecular, subcelular, celular e intercelular. Generalmente el orden en que se han empezado a estudiar ha sido...

decreciente, es decir el problema de la complejidad se ha abordado de los tejidos a las moléculas.

Recientemente se han encontrado algunos agregados moleculares como : el agregado que forma componentes de la cadena oxidativa que transporta electrones desde los sustratos oxidables hasta el oxígeno y que se acoplan con la síntesis de ATP. Están localizados en la mitocondria y organizados en forma de agregados que constituyen bloques, los cuales han sido designados como complejos I, II, III, y IV ( Green, y Whorton, 1963 ; Fernández-Moran, Oda, Blair y Green, 1964; Blair, Oda, Green y Fernández-Moran, 1963 ).

Se ha descrito, también que las enzimas que catalizan la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico se organizan formando un agregado que se localiza en la mitocondria de las células animales y de plantas y en la membrana de bacterias E.coli. (Koike, Reed y Corrol, 1960,1963). Se ha visto que está formado de : 16 moléculas de piruvato de descarboxilasa que contiene pirofosfato de tiamina, un agregado de lipoico reductasa transacetilasa que contiene 64 subunidades , cada uno con ácido lipoico; 8 moléculas de dihidrolipoato deshidrogenasa conteniendo 2 moléculas de FAD por molécula de enzima. El agregado tiene un peso molecular de  $3.9 \times 10^6$  Además es posible separar el agregado en sus componentes y éstos vuelven a unirse (Reed y Oliver, 1968). Su organización macromolecular se ha observado claramente en el microscopio electrónico (Williams, Oliver y Henney, 1967; Fernández-Morán, Reed y Koike, 1969 ).

decreciente, es decir el problema de la complejidad se ha abordado de los tejidos a las moléculas.

Recientemente se han encontrado algunos agregados moleculares como : el agregado que forma componentes de la cadena oxidativa que transporta electrones desde los sustratos oxidables hasta el oxígeno y que se acoplan con la síntesis de ATP. Están localizados en la mitocondria y organizados en forma de agregados que constituyen bloques, los cuales han sido designados como complejos I, II, III, y IV ( Green, y Whorton, 1963 ; Fernández-Moran, Oda, Blair y Green, 1964 ; Blair, Oda, Green y Fernández-Moran, 1963 ).

Se ha descrito, también que las enzimas que catalizan la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico se organizan formando un agregado que se localiza en la mitocondria de las células animales y de plantas y en la membrana de bacterias E. coli. ( Koike, Reed y Corrol, 1960, 1963 ). Se ha visto que está formado de : 16 moléculas de piruvato de descarboxilasa que contiene pirofosfato de tiamina, un agregado de lipoico reductasa transacetilasa que contiene 64 subunidades, cada uno con ácido lipoico; 8 moléculas de dihidrolipoato deshidrogenasa conteniendo 2 moléculas de FAD por molécula de enzima. El agregado tiene un peso molecular de  $3.9 \times 10^6$  Además es posible separar el agregado en sus componentes y éstos vuelven a unirse ( Reed y Oliver, 1968 ). Su organización macromolecular se ha observado claramente en el microscopio electrónico ( Williams, Oliver y Henney, 1967 ; Fernández-Morán, Reed y Koike, 1969 ).

La descarboxilación oxidativa del ácido  $\alpha$  ceto-glutárico se lleva a cabo en un agregado muy similar al descrito anteriormente ( Sanadi, 1961 ).

Por otro lado se ha encontrado en la fracción sobrenadante un agregado multienzimático que biosintetiza ácidos grasos y ésta formado por seis actividades enzimáticas diferentes. Se ha encontrado en animales y en levaduras, éste último ha sido extensamente estudiado por Lynen (1961, 1967, 1964, 1965, 1969). Se ha propuesto que estas enzimas se encuentran alrededor de un grupo sulfidrilo central al que se unen los metabolitos intermediarios por unión covalente, de modo que puedan estar en contacto con los sitios activos de las enzimas (Lynen y cols). Tiene un peso molecular de  $2.3 \times 10^6$  y se han obtenido microfotografías en el microscopio electrónico (Hagen y Hofschneider, 1964; Lynen, 1967). recientemente ha sido cristalizado (Lynen, 1969).

Otro ejemplo de agregado multienzimático es la triptofano sintetasa ( Reed y Cox, 1966; Yanofsky, 1960; Truffa-Bachi y Cohen, 1968; Henning, 1966; Umberger, 1964 ). La sintetasa en E. Coli , está formado de dos tipos de subunidades: las  $\alpha$  y  $B_2$  . Son fácilmente disociados y son proteínas completamente diferentes. Las subunidades separadas tienen actividad enzimática parcial en relación a la actividad del agregado.

Es interesante el descubrimiento de estos agregados, pues indican la gran organización estructural de la célula.

Algunas de las ventajas que tendría la célula con estos agregados sería una mejor regulación de las vías metabólicas y un flujo encauzado de los metabolitos (Mora, 1969). Actualmente la existencia de los agregados, parece ser un fenómeno más general de lo que se pensaba (Ginsburg y Stadman, 1970), pues el número de agregados multienzimáticos reportados ha aumentado considerablemente.

Los agregados reportados actualmente son complejos, hasta cierto punto estables, los cuales no son fácilmente dissociables. Sin embargo, se plantea la pregunta ¿no hay complejos de tipo más labil que con los métodos de preparación usados; se disocian y no se localicen como tales? Pensamos que la integración de la arginasa con las enzimas formadoras de arginina y probablemente todas las enzimas del ciclo están unidas en forma débil y al hacer las preparaciones se separan. Por otro lado este tipo de complejo resultaría ventajoso para la célula, pues podría ensamblarse sólo cuando la célula lo necesitara y disociarlo cuando no fuera utilizado. Por ejemplo tenemos el caso del polisoma, en donde además de establecerse la unión proteíca y ácidos nucleicos existe la relación de un recambio de ribosomas durante la síntesis de proteínas (Wamer y Rich, 1964).

Sería importante también la regulación de la actividad enzimática por la interacción de las moléculas en el proceso de asociación-disociación, pues podría haber activación e inhibición de las enzimas integrantes del agregado dependiendo de la concentración

de metabolitos intermediarios del ciclo, este tipo de agregados por sus características sería difícil de obtener en la misma forma que los agregados mencionados anteriormente.

Para el estudio de complejos lábiles es necesario la introducción de diferentes metodologías; pensamos que el sistema que hemos utilizado es adecuado para el estudio de estos sistemas integrados.

## REFERENCIAS.

1. Alfrey, V. The Cell. Brachet y Mirsky, Eds. Academy Press. Nueva York, p. 193, 1959.
2. Bascur, L., Cabello, J., Veliz, M. and González A. Biochem, Biophys, Acta 128 : 149-154, 1966.
3. Bishop, S.H. and Campbell, J.W. Science 142: 1583-1585, 1963.
4. Borman, A., Wood, R.T., Black, C.H., Anderson, G.W., Osterling, M.J. Womack, M. and Rose, C.W. J. Biol. Chem. 166: 585-595, 1946.
5. Brown, G.W. Jr. Arch. Biochem. Biophys. 114 : 186- 1966.
6. Brown, G.W. Jr. and Cohen, P.P. Fed. Proc. 17: 197, 1958
7. Brown, G.W. Jr. and Cohen, P.P. Biochem. J. 75: 82, 1960
8. Burnett, G.H., and Cohen, P.P. J. Biol. Chem 229: 337-344, 1957.
9. Cañedo, L., Martuscelli, J. and Mora, J. II Monogr. Nat. Cancer Inst. 27: 273-282, 1967
10. Castañeda, M., Martuscelli, J. and Mora, J. Biochim. Biophys, Acta 141: 276-286, 1966.
11. Cohen, P.P. The Harvey Lectures: Series 60. Academic Press, New York and London, 1966, p. 119-154.
12. Cohen, P.P. and Brown, C.W. Jr. M.F. Florkin and H. S. Mason (Eds). Comparative Biochemistry. New York and London; Academic Press, 1960. Vol. 2 p. 14-244
13. Cohen P.P. and Hayano, M. J. Biol. Chem. 172: 405, 1948
14. De Moss, J.A., Wegman, J., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 54 : 241, 1965.
15. Estrada, O.S., Carabez, A., and Cabeza, C. Biochemistry 5: 5432-5490, 1966.

16. Fernández-Mora, G., Oda, T., Blair, P.V. and Green, D.E. J. Cell Biol. 22: 63-100, 1964.
17. Fernández-Moran, H., Reed, L.J., Koike, M., Williams, C.R. Science, 145: 930, 1964
18. Green, D.E. and Wharton, D.C. Biochem 2 338: 335-348 1963.
19. Ginsburg, A. and Stadman, E.R. Ann Rev. Biochem. 39: 728, 1970.
20. Greenberg, O.M., Basot, A.E. and Roholt, O. A. Jr. Arch. Biochem. 63: 446-453, 1956.
21. Henneing, U., Angew. Chem Inter. Ed. Engl. 5, 785, 1966.
22. Holt, D.F., Gyorsy, P., Pratt, L.E. Synderman, N.E. and Walls, W.M. Univ. Press. New York, 1960, pp. 32
23. Koike, M., Reed, L.J., Carroll, W.R., J. Biol. Chem. 235: 1924. 1960.
24. Kortiz, S.B. y Cohen, P.P. J. Biol. Chem. 209: 145, 1954
25. Lynen, F., Fed. Proc. 20: 941, 1961
26. Lynen, F., Hopper-Kessel, I., Eggerer, H. Biochem. Z. 340: 95, 1964.
27. Lynen, F., Perspectives in Biology and Medicine, 12: 204 1969.
28. Lynen, F. Biochem. J. 102: 381, 1967
29. Lynen, F., Progr. Biochem. Pharmacol., 3: 1, 1967.
30. Lynen, F., Angew, Chem. 77: 929, 1965
31. Lynen, F., Angew, Pure, Appl. Chem. 14: 137, 1967
32. Mora, J., Tarrab, R., Martuscellim J., and Soberón, G. Biochem. J. 96: 588-594, 1965

33. Mora, J., Martuscelli, J., Ortiz-Pineda, J. and Soberón, G. *Biochem J.* 96: 28-35, 1965.
34. Mora, J. en *Ensayos Bioquímicos*. (Edt. G. Soberón.) La Prensa Medica Mexicana, México 1969 p. 231.
35. Mora, J., Tarrab, R., and Bojalil, L.F. *Biochem. Biophys. Acta.* 118: 206-209, 1966.
36. Nason, A. Symposium on metabolism of inorganic compounds.
37. Palacios, R., Tarrab, R., and Soberón, G. *Biochem J.* 110: 425-433, 1968.
38. Palacios, R., Huitrón, C. and Soberón, G. *Biochem J.* 114: 449, 1969.
39. Palacios, R., Huitrón, C. and Soberón, G. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 38: 438, 1970.
40. Ratner, S., and Petrack, B. *J. Biol. Chem.* 200: 161-174, 1953.
41. Ratner, S. *Advances in Enzymology.* 15: 319-387, 1954.
42. Reed, L.J., Cox, D.J. *Ann. Rev. Biochem.* 35: 57, 1966.
43. Reed, L.J., Oliver, R.M., *Brookhaven Symp. Biol.*, 21: 397, 1968.
44. Rogers, Q.R. and Freedlna, R.A. *Fed. Proc.* 27: 257, 1968.
45. Rohot, O.A., Jr. and Greenberg, D.M. *Arch. Biochem.* 62: 446-453, 1956.
46. Snad, D.R. P.D. Bayer, H. Lardy and K. Myrback (Eds). *The enzymes* Academic Press, New York and London, 1961 7: 307-344.
47. Soberón, G., Tarrab, R., Palacios, R. *Bol. Estud. Med. Biol.* 26: 15, 1969.
48. Soberón, G., Ortiz-Pineda, J. and Tarrab, R. *National Cancer Institute Monograp.* 27 p. 283, Ed. by Stalberg. M.D. Bethesda, Md, U.S.A. (1967).

49. Soberón, G., Palacios, R. and Tarrab, R.  
Fed. Proc. 27: 335, 1968.
50. Truffa-Bachi, P., Cohen, G.N. Ann. Rev. Biochem. 37:79, 1968.
51. Umbarger, H. E., Ann. Rev. Biochem. 38: 323, 1969.
52. Van Piiscan, J.E., Morton, A.A. Kito, E. and Hoss, J.  
J. Biol. Chem. 222: 225, 1956.
53. Warner, J.R., and Rich. A. J. Mol. Biol. 10: 202, 1964.
54. Williams, C.R. Oliver, R.M., Henney, H.R. Mokhrjee, B.B.  
reed, L.J. J. Biol. Chem. 242: 889, 1967
55. Yanofsky, C., Bacteriol. Rev. 24: 221, 1960