

Propiedades físico-químicas de la arginasa de hígado de cobaya *

G. Soler, F. J. Mataix y M. Ruiz-Amil

Departamento de Bioquímica
Facultad de Veterinaria
Madrid - 3

(Recibido el 6 de marzo de 1980)

G. SOLER, F. J. MATAIX and M. RUIZ-AMIL. *Physico-Chemical Properties of Guinea Pig Liver Arginase*. Rev. esp. Fisiol., 37, 37-44. 1981.

Arginase (E.C. 3.5.3.1.) the enzyme which catalyses the hydrolysis of arginine to ornithine and urea has been investigated in guinea pig liver in relation to the kinetic constants of its substrate and inhibitors as well as to other physico-chemical properties. The results show that the enzyme has K_m value of 19.6 mM for its substrate L-arginine and is competitively inhibited by one of its reaction products, the L-ornithine, and also by L-lysine and diaminopymelic acid.

Optimal activity of the enzyme occurs at 10.5 pH and maximal stability in the range of 6.5 to 7.5 pH.

The mentioned arginase exhibits temperature dependent activity and stability, being 64° C (15 min at pH 7.5) the half-inactivation temperature.

An increase in the activity and temperature stability of the enzyme, when previously activated by heating for 5 min at 45° C in the presence of 10 mM $MnCl_2$, has been achieved.

La arginasa (L-arginina amidinohidrolasa) (E.C. 3.5.3.1.), enzima que cataliza la hidrólisis de L-arginina en L-ornitina y urea, constituye la enzima de la etapa final del ciclo de la urea en animales, así como el de la inicial en la utilización de arginina por microorganismos.

* Realizado con ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica de la Presidencia de Gobierno y en parte con aparatos donados por la Fundación Alexander von Humboldt. Parte de este trabajo fue presentado al VII Congreso de la S.E.B. Pamplona, 1977.

Esta enzima ha sido purificada e investigadas sus características moleculares en varias especies animales, destacando los estudios realizados en hígado de rata (9, 13, 18), buey (8, 13) y caballo (13). Entre sus propiedades destaca la necesidad de Mn^{2+} para la formación de un complejo activado, así como la activación de la enzima por este catión, como ha sido demostrado en hígado de rata (10), bovino (8) y conejo (20).

En el presente trabajo se estudia el efecto del Mn^{2+} sobre la arginasa de hígado de cobaya, así como las constantes

cinéticas de su substrato e inhibidores. Asimismo se completa dicho estudio con el de otras propiedades físico-químicas tales como actividad y estabilidad en función del pH y comportamiento frente a la temperatura.

Material y métodos

Reactivos. L-arginina, L-ornitina y L-lisina procedían de Merck y el ácido diaminopimélico de Sigma. Otros productos químicos utilizados eran de grado analítico.

Material biológico. Se han utilizado cobayas machos adultos con un peso comprendido entre 500 y 600 g, alimentados *ad libitum* con una dieta formada por alfalfa y una mezcla de cebada, avena y salvado de trigo a partes iguales.

Ensayos de actividad enzimática. Los extractos enzimáticos se prepararon por homogeneización de 2 g de hígado del animal, recién sacrificado por sección de las carótidas, con dos volúmenes de agua destilada. El homogeneizado del mismo se centrifugó a 0-4° C durante 30 min a 16.000 × g y se determinó la actividad enzimática en el sobrenadante mediante la medida de la urea formada a partir del substrato L-arginina según la técnica descrita por SCHIMKE (19). La composición de la mezcla de reacción fue de 450 μmoles de L-arginina, pH 9,7 y 1 μmol de Cl₂Mn; a esta mezcla se le añadió 0,1 ml de extracto enzimático convenientemente diluido según los casos, siendo el volumen final de 1,1 ml. La activación de la enzima se realizó adicionando a 0,9 ml de extracto (diluido a 1/40 con tampón fosfato 0,02 M pH 7,5) 0,1 ml de Cl₂Mn 0,1 M y calentando en baño maría 5 min a 45° C. Tras este tratamiento se centrifugó la mezcla durante 10 min a 10.000 × g a 0-4° C.

Para las medidas de actividad y estabi-

lidad enzimática en función del pH se utilizó la enzima activada por Mn²⁺.

Resultados

Activación de la arginasa por Mn²⁺. Se determinaron en primer lugar las condiciones de activación básicas para los estudios enzimáticos presentados en este trabajo y así se ha encontrado una concentración óptima de Mn²⁺ de 10 mM y dos máximos de activación térmica a 45° C y 85° C.

Por ello la preincubación de la enzima en orden a su activación se llevó a cabo a la concentración determinada y a 45° C.

Actividad y estabilidad enzimática en función del pH. La arginasa de hígado de cobaya presenta su máxima actividad a pH 10,5, con alrededor de un 50 % de la actividad máxima a pH 9 y 11,5. A partir de pH 6,5 y 12,0 se anula la actividad. Puesto que la enzima es activa en un 90 % a pH 9,7, se ha elegido este pH para todas las valoraciones a fin de evitar la precipitación de Mn²⁺ en forma de Mn(OH)₂ que tiene lugar a pH superior.

Con respecto a la estabilidad enzimática, la arginasa de hígado de cobaya es estable durante 15 min a 30° C a pH comprendido entre 6,5 y 7,5; a pH 6,0 y 9,5 la estabilidad es de un 50 % aproximadamente.

Influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática. Se ha determinado siguiendo la evolución en la velocidad de reacción en un amplio intervalo de temperatura. Los resultados obtenidos han permitido calcular la energía de activación de ARRHENIUS, resultando ser de 53,5 KJ/mol. Asimismo se ha calculado el coeficiente de temperatura Q₁₀, cuyos valores a distintos intervalos de temperatura han sido de 2,80 para 10-20° C, 2,20 para 20-30° C, 1,65 para 30-40° C y 1,60 para 40-50° C.

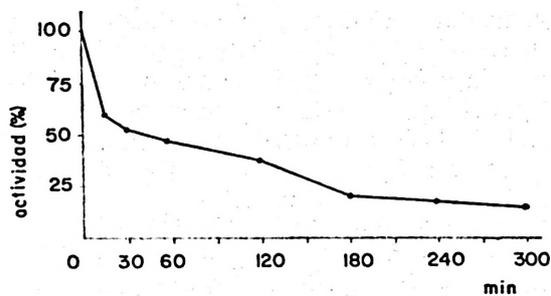


Fig. 1. Inactivación en función del tiempo de calentamiento a temperatura constante de 64° C.

Se ha investigado también la estabilidad de la enzima mantenida durante 15 min a pH 7,5 a distintas temperaturas. Los resultados muestran que la enzima es termoestable hasta los 45° C, inactivándose progresivamente a partir de ahí. La temperatura de semiactivación corresponde a 64° C, con la cual se han realizado estudios de cinética de inactivación en función del tiempo de calentamiento. Los resultados muestran el proceso de inactivación enzimática a medida que aumenta el tiempo de tratamiento (fig. 1).

Tanto este ensayo como el descrito en el párrafo anterior se han realizado usando enzima sin activación previa con Mn^{2+} . También se ha investigado la actividad de la arginasa previamente activada con Mn^{2+} frente al tiempo de calentamiento a distintas temperaturas, encontrándose que la vida media de la enzima a 70° C es de 210 min, a 75° C 80 min y a 80° C 8 min (fig. 2).

Constantes cinéticas de la arginasa de hígado de cobaya. Se ha determinado la K_m de la arginasa respecto a su sustrato L-arginina y la K_i para un conjunto de sustancias análogas estructurales de la arginina, así como el tipo de inhibición que presentan (fig. 3). La constante de Michaelis encontrada para la arginina es 19,6 mM. En relación con los inhibidores se han ensayado tres análogos estructura-

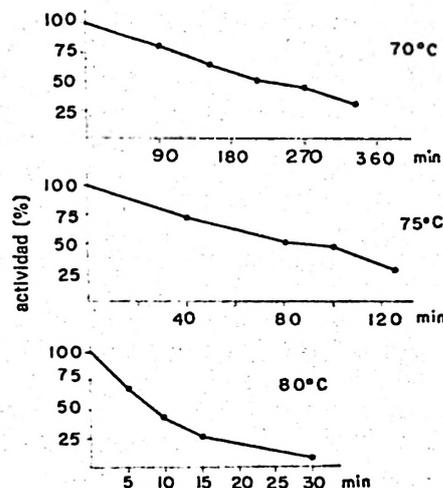


Fig. 2. Estabilidad de la enzima previamente activada con Mn^{2+} frente al tiempo de calentamiento.

les de L-arginina como son L-lisina, L-ornitina y ácido diaminopimélico.

L-lisina y L-ornitina y ácido diaminopimélico se manifiestan como inhibidores competitivos. La L-lisina tiene una K_i de

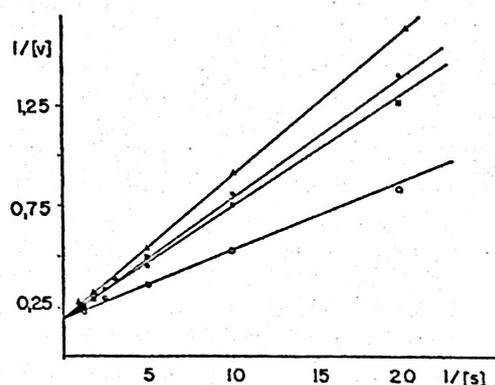


Fig. 3. Constante de Michaelis e inhibición competitiva de la arginasa por lisina, ornitina y ácido diaminopimélico.

(O—O) Sin inhibidor, K_m (arginina) = 19,6 mM. (●—●) L-lisina (0,5 mM); K_i = 0,6 mM. (▲—▲) L-ornitina (4,0 mM); K_i = 3,0 mM. (■—■) Acido diaminopimélico (6 mM); K_i (mezcla de isómeros) = 10 mM.

0,6 mM siendo 3 mM la K_i de la L-ornitina. La K_i del ácido diaminopimérico es 10 mM si se considera la concentración de los tres estereoisómeros en conjunto y 3,3 mM si se tiene en cuenta que sólo el ácido mesodiaminopimérico es activo por ser el que se encuentra en forma natural en microorganismos.

Finalmente, en un intento de investigar el pH de máxima afinidad de la arginasa para su substrato L-arginina se han determinado las K_m a distintos valores de pH de la mezcla de reacción. Los resultados ponen de manifiesto que la enzima presenta máxima afinidad por el substrato a pH comprendido entre 10 y 10,5.

Discusión

En relación con las propiedades de la arginasa, GREENBERG (5) afirma: «La profusión de métodos experimentales diferentes en los ensayos de la arginasa hace extremadamente difícil la comparación de los resultados de los diferentes autores». A este respecto conviene indicar que los estudios físico-químicos sobre la arginasa de hígado de cobaya que se presentan en este trabajo se han realizado en extracto crudo, en contraste con la mayoría de los trabajos llevados a cabo con arginasa de otros orígenes, en los que se ha empleado enzima parcial y altamente purificada.

En relación con la actividad de la arginasa de hígado de cobaya en función del pH de la mezcla de reacción, los resultados ponen de manifiesto un pH óptimo de 10,5, resultado que es concordante con el pH óptimo encontrado por HIRSCHKOLB *et al.* (9) para la enzima de rata, cerdo, ratón y mono y muy próximo al de caballo y conejo que según estos autores es de 10,3 y 10, respectivamente; difiere, sin embargo, del pH óptimo para la arginasa de hígado de buey (8). Por otra parte, si se compara el valor obtenido en cobaya con el de SCHIMKE (19) que encuentra para la enzima purificada de hí-

gado de rata, alimentada 14 días con una dieta del 70 % de proteínas, un pH óptimo de 9,4-9,7, se aprecia una notable diferencia que podría explicarse por la aparición de otra especie isoenzimática al someter a la rata a las condiciones indicadas de alta dieta proteica, ya que la K_m encontrada para la arginasa de rata en estas condiciones es de un orden de magnitud menor que la encontrada por MORA *et al.* (13), también en hígado de ratas, pero no sometidas a esa alimentación.

El pH de máxima estabilidad es prácticamente el mismo que el descrito para la enzima de otros orígenes (1, 4, 10) que son los referidos al pH empleado en la diálisis.

En cuanto a la influencia de la concentración de Mn^{2+} y temperatura de activación de la enzima, trabajos en rata (10) y buey (8) establecen que la arginasa es un tetrámero que necesita para su máxima actividad 4 átomos de Mn, uno por cada monómero (E-Mn₄) y que la pérdida de uno o varios de ellos lleva aparejada una disminución proporcional de actividad. Asimismo la recuperación de la actividad total se lleva a cabo mediante tratamiento de la enzima a 50° C, en presencia de Mn^{2+} . El valor de actividad encontrada para hígado de cobaya en condiciones nativas es aproximadamente la mitad del que aparece cuando la enzima se activa con Mn^{2+} , por lo que es posible que la obtención del homogeneizado afecte la unión de dos átomos de Mn^{2+} si en el cobaya se cumpliera la proporcionalidad descrita para rata y buey. La concentración óptima de Mn^{2+} para obtener activación máxima de la enzima de cobaya ha resultado ser de 10 mM, cantidad muy inferior a la necesaria para la arginasa de rata (10) y buey (8) que están entre los límites de 40-50 mM. Por otra parte se han encontrado dos temperaturas para la activación de la arginasa de hígado de cobaya, objeto de este trabajo, una a 45° C, en la que se consigue un 75 % de activación, y otra con un

100% de activación. Estos resultados son difícilmente comparables con los obtenidos por los autores antes citados (8, 10), que sólo describen una sola temperatura de activación por Mn^{2+} .

En cuanto a la estabilidad frente a la temperatura, la arginasa de hígado de cobaya es estable hasta los $45^{\circ}C$ a pH 7,5, lo que concuerda con los resultados de HUNTER (11) y presenta una temperatura de semiactivación de $64^{\circ}C$ en 15 min. A esta temperatura se han llevado a cabo los estudios de actividad en función del tiempo de calentamiento cuyos resultados (fig. 1) están de acuerdo con lo descrito por GREENBERG y MOHAMED (7) para la enzima de hígado de rata.

En relación al comportamiento respecto a la temperatura por una parte, y a la necesidad de la unión de la enzima con Mn^{2+} por otra, pareció interesante conocer si el Mn^{2+} afectaba no sólo a la actividad de la enzima, sino si también ejercía alguna acción protectora frente a la temperatura. Los resultados obtenidos con tres temperaturas ($70^{\circ}C$, $75^{\circ}C$ y $80^{\circ}C$) frente a tiempos variables y con enzima activado con Mn^{2+} , indican que la activación por Mn^{2+} aumenta drásticamente la resistencia de la enzima frente al calor, siendo además más resistente que la arginasa de hígado de caballo, que es la única descrita en la literatura en lo que concierne a este comportamiento.

La energía de activación obtenida para la reacción catalizada por la arginasa de hígado de cobaya a pH 10,5 y en los intervalos de temperatura entre 25° y $65^{\circ}C$ fue de 53,5 KJ/mol, resultado similar a los encontrados por GREENBERG y MOHAMED (7) y por HUNTER (11) para la enzima de hígado de caballo, aunque existen algunas diferencias tal vez imputables al distinto origen de la enzima y las distintas condiciones de ensayo.

Los valores de Q_{10} expuestos en el presente trabajo sólo se pueden comparar con los de SCHIMKE (17) para la enzima de rata que obtiene un valor muy seme-

jante para el intervalo de 25 a $35^{\circ}C$ y con los de HUNTER (11), que estudiando la arginasa de hígado de caballo en un intervalo de temperatura entre 20 y $30^{\circ}C$ encuentra un valor notablemente inferior.

En relación con otras constantes cinéticas se ha estudiado la influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción, y así la K_m obtenida en nuestros ensayos con hígado de cobaya a pH 9,7 es de 19,6 mM, valor muy similar a los encontrados por diversos autores para la arginasa de diversos orígenes (3, 7, 10); tan sólo se aparta de este valor el encontrado por COLOMBO *et al.* (2) en arginasa de hígado de buey, para la que obtiene una K_m de 132 mM. Por otra parte, y de un modo general, se observa que los valores de K_m de la arginasa son más elevados que los que presentan las otras enzimas del ciclo de la urea en hígado de cobaya (14), lo que aparte de indicar una menor afinidad de la enzima por su sustrato habla en favor de una posible regulación del ciclo a nivel de la arginasa por la concentración de la arginina.

En este mismo contexto, la influencia del pH sobre la afinidad, estudiada sobre la base de la determinación de las K_m a diferentes pH, muestra que la arginasa de hígado de cobaya presenta la máxima afinidad por el sustrato a pH comprendido entre 10 y 10,5 con valor de K_m de 10 mM, que, si bien superior, es del mismo orden de magnitud que el encontrado por ROHOLT y GREENBERG (15) de 2,8 mM para la enzima de hígado de caballo. En ambos casos, se observa que los pH de máxima afinidad coinciden exactamente con los pH de máxima actividad.

Respecto a la inhibición de los tres compuestos análogos estructurales ensayados, la lisina presenta inhibición competitiva con una K_i de 0,6 mM que se diferencia notablemente de la encontrada en rata por HUNTER y DOWS (12), cuyo valor asciende a 4,8 mM y aun más de los citados por COLOMBO *et al.* (2) para hígado humano y de bovino, que son 95

y 65 mM, respectivamente. Este hecho pone de manifiesto que la lisina tiene un poder inhibitor sobre la arginasa de hígado de cobaya muy superior al que ejerce sobre la arginasa de otros orígenes, máxime si se admite que la concentración de lisina descrita en hígado de rata por SAHEKI *et al.* (16), 0,353 μ moles/g de hígado, sea comparable a la que pueda existir en hígado de cobaya.

La ornitina mostró inhibición competitiva con una K_i 3 mM, resultado que es muy próximo al encontrado (4 mM) por HUNTER y DOWNS (12) en hígado de ternero y que no concuerda con el de MORA *et al.* (13), que postulan una inhibición de tipo no competitivo para arginasa de hígado de rata, ni con el de BEDINO (1), que describe una inhibición de tipo alostérico para la enzima de hígado de bovino. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos últimos autores emplean en sus experimentos concentraciones de ornitina entre 5 y 80 mM (1) y 100 mM (13), concentraciones muy poco probables de encontrar en la célula hepática aun en los estados patológicos más extremos, ya que las cifras descritas por distintos autores (14, 16) están comprendidas en 0,018 y 0,043 μ moles/g de hígado. Las elevadas concentraciones de ornitina antes mencionadas podrían afectar la cinética enzimática en tal sentido que los resultados obtenidos por los mencionados autores no sean extrapolables al comportamiento normal de la célula hepática.

En cuanto al ácido diaminopimélico, la inhibición es de tipo competitivo y el valor de su K_i es de 3,3 mM si se considera que sólo ejerce el efecto inhibitor el compuesto *meso*, o de 10 mM si son las formas *DD*, *LL* y *meso* que componen el producto comercial las que ejercen la acción.

Los resultados obtenidos con los tres compuestos estudiados permiten deducir que una alteración en sus niveles intracelulares podría afectar el funcionamiento del ciclo de la urea. En relación con la

lisina, COLOMBO *et al.* (2) mencionan que un defecto de la lisina: NAD⁺ oxidoreductasa produce un aumento intracelular de la concentración de lisina que, al inhibir la arginasa, puede descompensar gravemente el ciclo de la urea produciendo una alteración en la detoxicación del ion amonio.

Los resultados discutidos anteriormente con respecto a ciertas propiedades físico-químicas de la arginasa de hígado de cobaya permiten destacar la importancia de estos estudios para un mejor conocimiento de la posible actuación *in vivo* de esta enzima en relación con las situaciones metabólicas que pueden presentarse en lo que concierne a variaciones de pH, temperatura y concentración de iones y metabolitos.

Resumen

Se investiga la arginasa (E.C.3.5.3.1.) en hígado de cobaya con respecto a sus constantes cinéticas y a otras propiedades físico-químicas. La enzima muestra una K_m para su substrato arginina de 19,6 mM y es inhibida competitivamente por L-ornitina, uno de sus productos de reacción, y también por L-lisina y ácido diaminopimélico. El pH de máxima actividad para la mencionada arginasa es 10,5, presentando máxima estabilidad a pH comprendido entre 6,5 y 7,5. La actividad y la estabilidad de la citada enzima es también dependiente de la temperatura, siendo la temperatura de semiactivación (15 min a pH 7,5) de 64° C. Por otra parte, el tratamiento previo de la enzima con Mn²⁺ 10 mM durante 5 min a 45° C incrementa tanto la actividad como la estabilidad frente a la temperatura, debido a la formación de un complejo E-Mn.

Bibliografía

1. BEDINO, S.: *Ital. J. Biochem.*, 26, 264-276, 1977.
2. COLOMBO, J. P., BACHMANN, C., TERHEGGEN, LAVINA, F. y LOWENTHAL, A.: En «The Urea Cycle» (Grisolia, S., Bagena, R. y Mayor, F., eds.). Wiley and Sons. Nueva York, 1976, pp. 415-424.

3. GREEMBAUN, A. L., GUMARD, K. A. y MC LEAN, B.: *Arch. Biochem Biophys.*, 143, 617-635, 1971.
4. GREENBERG, D. M.: *Methods Enzymol.*, 2, 368-374, 1955.
5. GREENBERG, D. M.: «The Enzymes». (Boyer, P. D., Lardy, H. y Myrback, K., eds.) Academic Press. Nueva York. Vol. IV/2, 1960, pp. 257-267.
6. GREENBERG, D. M., BAGOT, A. E. y ROHOLT, D. A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 62, 446-453. 1956.
7. GREENBERG, D. M. y MOHAMED, M. S.: *Arch. Biochem.*, 8, 365-375, 1945.
8. HARELL, D. y SOKOLOUSKY, N.: *Eur. J. Biochem.*, 25, 102-108, 1972.
9. HIRSCH-KOLB, H., KOLB, H. J., GREENBERG, D. M. y HEINE, H.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 37, 345-359, 1970.
10. HIRSCH-KOLB, H., KOLB, H. J. y GREENBERG, D. M.: *J. Biochem.*, 246, 395-401, 1971.
11. HUNTER, A.: *J. Exptl. Physiol.*, 24, 177-188, 1934.
12. HUNTER, A. y DOWNS, C. E.: *J. Biol. Chem.*, 157, 427-446, 1945.
13. MORA, J., TARRAB, R. y BOJALIL, L. F.: *Biochim. Biophys. Acta*, 118, 206-209, 1966.
14. RATNER, S.: *Advances Enzymol.*, 39, 1-90, 1973.
15. ROHOLT, D. A. Jr. y GREENBERG, D. M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 62, 454-470, 1965.
16. SAHEKI, T., TSUDA, M., TANAKA, T. y KATUNUMAN, N.: *J. Biochem.*, 252, 5287-5296, 1975.
17. SCHIMKE, R. T.: *J. Biol. Chem.*, 237, 459-468, 1962.
18. SCHIMKE, R. T.: *J. Biol. Chem.*, 239, 3808-3817, 1964.
19. SCHIMKE, R. T.: *Methods Enzymol.*, 17, 313-317, 1970.
20. VIELLE-BREITBURD, F. y ORTH, G.: *J. Biol. Chem.*, 247, 1227-1235, 1972.

