Acta Veterinaria 7: 91-95, 1994

IMPORTANCIA FISIOLOGICA DE LA ARGINASA DE GLANDULA MAMARIA EN LACTACION

Autor: J. M. Fuentes

Dirección: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Avda. de los Quijotes, s/n. 10071 Cáceres.

En los animales superiores la excreción del nitrógeno amínico puede llegar a ser un proceso crítico debido a la toxicidad de algunos derivados nitrogenados, fundamentalmente del amoníaco. Si bien es cierto que a pH fisiológico el elevado pK del NH_3 (pK = 9,25) hace que se encuentre mayoritariamente en forma de catión (NH_4^+), que no atraviesa con facilidad las membranas celulares, también lo es que la pequeña cantidad de NH_3 existente (1 % a pH 7,4) atraviesa sin dificultad tanto la membrana celular como la mitocondrial, siendo captado rápidamente por el α-cetoglutarato que se transforma, de esta manera en glutamato, provocando así una disminución en los niveles de uno de los intermediarios del ciclo de Krebs, con lo que la eficacia generadora de energía del ciclo es menor. Este hecho puede resultar particularmente peligroso para la célula nerviosa, pudiendo llegar a producirse, en ocasiones, situaciones de coma. Los vertebrados superiores, en los que la mayoría de las células no están en contacto directo con el medio ambiente, carecen de la posibilidad de eliminar el NH_3 por simple difusión, o por transporte a través de la membrana y han evolucionado hasta desarrollar un proceso metabólico que les permite convertir el amoníaco en un producto menos tóxico y fácilmente excretable como es la urea. Dentro del conjunto de reacciones conocido como ciclo de la urea o ciclo de la ornitina, la urea junto con la ornitina, son el resultado de la hidrólisis de la arginina por la arginasa (L-arginina amidinohidrolasa, E.C. 3.5.3.1.) suponiendo el último paso en la transformación de este amoníaco en urea.

La principal función de la arginasa en el hígado de animales ureotélicos es la producción de urea como forma de excreción de iones amonio derivados del catabolismo de aminoácidos. El otro producto de la reacción, la ornitina, es un intermediario del ciclo de la urea y también un precursor de la síntesis de aminoácidos como prolina y glutámico, así como de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina), las cuales juegan un importante papel en la división y diferenciación celulares (17, 9) y en la lactogénesis (15).

Sin embargo también se ha comprobado que existe actividad arginasa en tejidos desprovistos de un ciclo de la urea completo (7, 20). La función primaria de la enzima en estos tejidos, tales como la glándula mamaria o riñón, es precisamente la síntesis de prolina, glutámico y poliaminas (20), cubriendo así en parte, estos tejidos su necesidad de estos aminoácidos no esenciales.

El hecho de que el tejido hepático posea una actividad arginásica tan elevada [unas 15 a 5.000 veces superior a la de otros tejidos de mamíferos (8)] sugiere la posibilidad de que la arginasa tenga otras funciones además de la formación de urea y que pueda por ejemplo participar en la regulación de la síntesis de proteínas. Existen varias formas mediante las cuales la arginasa podría afectar a la síntesis de proteínas, siendo la más evidente la que resulta del control de la disponibilidad de arginina. En este sentido la actividad arginasa varía en respuesta a dietas de alto contenido proteico, hormonas o procesos patológicos (como por ejemplo la diabetes), cambios éstos que afectan al metabolismo de las proteínas (1).

Además de estas funciones metabólicas la arginasa puede jugar un importante papel en la respuesta inmune, mediante el control de los niveles de arginina del medio intracelular (control de la síntesis de NO) (11), en la inhibición del crecimiento tumoral (por reducción de los niveles de arginina del medio extracelular) (10) y en la síntesis de creatina para el almacenamiento de energía en el tejido muscular.

ARGINASA EN GLANDULA MAMARIA

Durante el período de lactación se produce un incremento en la acumulación de enzimas en la glándula mamaria siendo la arginasa una de ellas (4, 7, 20). Los niveles basales de arginasa en glándula mamaria virgen suponen apenas un 1 % del valor máximo que se alcanza en el decimoséptimo día de lactación. La evolución de la actividad arginasa entre ambos valores extremos sigue una curva de incremento paulatina hasta el décimo día de lactación, en el que se produce una fase de crecimiento rápido que concluye el decimoséptimo día. El descenso de la actividad arginasa desde el valor máximo es asímismo muy rápido, alcanzándose nuevamente los valores basales el quinto día poslactación (4, 20).

La proporción que representa la actividad arginasa de glándula mamaria de rata en lactación con respecto a la hepática es un parámetro sobre el cual la bibliografía consultada aporta valores distintos: 2,7 % (20), 4,5 % (2), 6,4 % (8) y 8 % (18). En otras especies, como por ejemplo la vaca, el valor observado es del 2 % (3).

Por ser la glándula mamaria un órgano fundamentalmente biosintético y no detoxificador, el papel de la arginasa en este tejido no parece que sea el formar parte del ciclo de la urea. Este hecho se ve avalado por la baja actividad de determinadas enzimas de este ciclo, en concreto de la dos primeras, es decir, carbamilfosfato sintetasa I y ornitina transcarbamilasa, que son prácticamente indetectables (20), lo cual apoya la idea de un ciclo de la urea no funcional. Por otro lado Mephan y Lincell (1966) para cabra y Clark y col. (1974) para vaca y conejo observan que los niveles de arginina que difunden desde el torrente circulatorio a la glándula mamaria son superiores en unas cuatro veces a los valores que presenta este aminoácido en las proteínas de la leche, observando además que se produce una entrada de ornitina que no se corresponde con la presencia de éste aminoácido en la leche, lo cual les lleva a postular la posible existencia de una relación de arginina y ornitina con la síntesis de otros aminoácidos no esenciales en glándula mamaria, como la prolina, pues la cantidad de prolina que pasa a este órgano es notablemente inferior a la que se secreta en las proteínas de la leche (12). La entrada de arginina marcada radiactivamente con ^{14}C desde el torrente circulatorio y su incorporación como prolina radiactiva en las caseínas ha sido demostrada en cabra y vaca (13) y rata (14). En el mismo ensayo se ha podido comprobar la no operatividad del ciclo de la urea, por la detección de ornitina pero no de citrulina radiactiva. Además, el incremento de la actividad arginasa se ve acompañado por el de las enzimas necesarias para la conversión de arginina en prolina y glutamato (ornitina aminotransferasa, Δ^1-pirrolin-5-carboxilato reductasa y Δ^1-pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasa), aumentando de una manera coordinada y proporcional al incremento de la producción de leche (14). De esta manera la diferencia entre la entrada de glutámico y prolina vía sanguínea y su salida formando parte de las proteínas de la leche (en especial caseínas) se ve compensada por la transformación en glutámico y prolina del exceso de arginina que penetra en la glándula mamaria, llegándose a la conclusión de que esta síntesis de prolina y glutámico en cantidades necesarias para la producción de leche, constituye el papel metabólico más relevante de la isoenzima de la arginasa presente en la glándula mamaria en lactación (14) (Fig. 1).

Por otra parte también una pequeña proporción de la ornitina producida por la

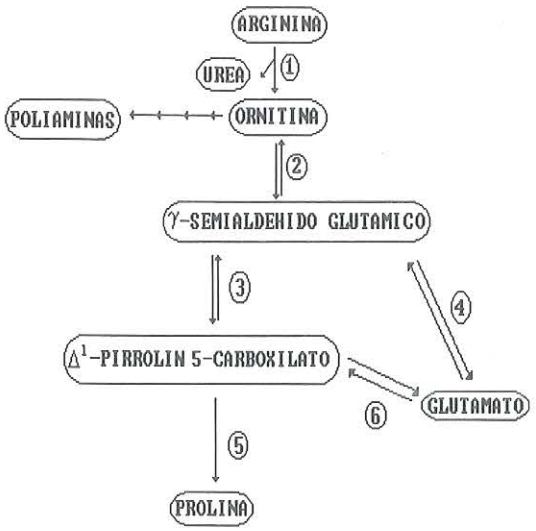

Figura 1.- Biosíntesis de prolina y glutámico a partir de arginina.

arginasa se canaliza hacia la síntesis de poliaminas (15, 19), como se demuestra por la aparición de putrescina, espermidina y espermina radiactivas tras la administración de DL-[1-^{14}C]-ornitina (Fig. 2). Además el incremento de las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de poliaminas (ornitina descarboxilasa, S-adenosil L-metionina descarboxilasa y espermidina sintetasa) discurren paralelamente (19, 20) al incremento de la actividad arginasa en el período de lactación (20), siendo en concreto la forma soluble de la arginasa de glándula mamaria la implicada en la síntesis de poliaminas (16). El papel de las poliaminas, en especial la espermidina, sobre la glándula mamaria es importante para la proliferación y diferenciación celulares (16) así como para la síntesis de proteínas (16, 19).

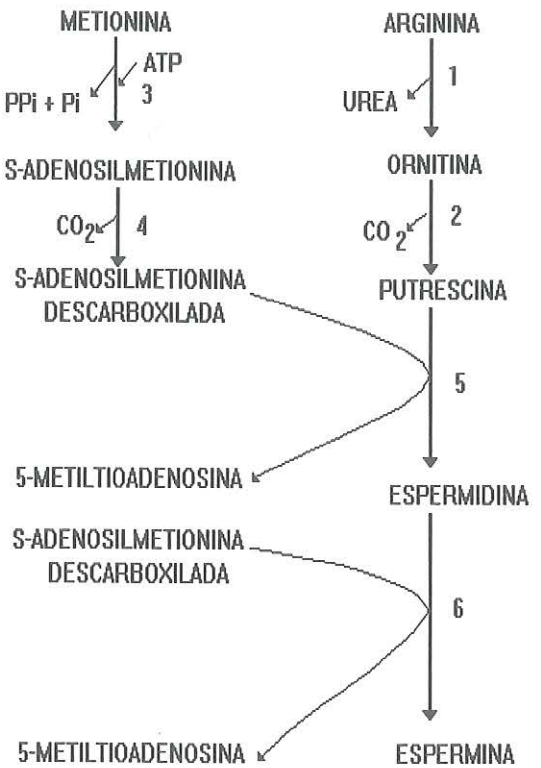

Figura 2.- Biosíntesis de poliaminas a partir de arginina.

El factor que influye sobre el incremento de la actividad arginasa en la glándula mamaria en período de lactación es de tipo hormonal. Así Oka y Perry (1974) describen que la incubación de explantes mamarios con insulina, hidrocortisona y prolactina simultáneamente, da lugar a un valor máximo de la actividad arginasa, mientras que la incubación con cada una de estas hormonas por separado o tomadas de dos en dos, produce incrementos mucho menores (15). Bajo el mismo tratamiento se observa también una activación de la ornitina descarboxilasa y de la espermidina sintetasa (16), aumentando por tanto los niveles de espermidina, la cual actuaría como mediador de la respuesta de las hormonas anteriormente citadas.

La arginasa de glándula mamaria es una enzima muy poco estudiada desde el punto de vista físico-químico. Glass y Knox (1973) indican que la arginasa de glándula mamaria en lactación es una enzima particulada que precisa para su solubilización 1-butanol; sin embargo Oka y col. (1978) citan la presencia de una isoforma minoritaria asociada a mitocondria y de otra isoforma mayoritaria citosólica. Estas isoformas se diferencian en su peso molecular, estabilidad térmica y grado de activación en presencia de cloruro de manganeso. Glass y Knox (1973) refieren dos picos de actividad para la arginasa de glándula mamaria en lactación extraíble con 1-butanol; uno de 42.000 de peso molecular y otro de 94.000,

Tabla I.—Algunas características de la arginasa de glándula mamaria de rata en lactación.

	Característica
Actividad arginasa en glándula mamaria en reposo	0,258 UI/g tejido
Actividad arginasa en glándula mamaria en lactación	24,6 UI/g tejido
Actividad arginasa soluble	81 %
Actividad arginasa no soluble	19 %
Peso molecular enzima nativa	176.000 Da
Contante de Michaelis (K_M)	18,5 mM

siendo su temperatura de activación de 55°C y la concentración óptima de manganeso de 10 mM. En cualquier caso tanto la forma particulada (6) como la soluble (18) no son inmunorreactivas frente anticuerpos antiarginasa hepática. La arginasa de glándula mamaria se puede situar dentro del grupo de las arginasas neutras o ligeramente ácidas migrando, por tanto, hacia el ánodo (18). Sin embargo, tanto Herzfeld y col. (1976) como Bor I. y Trauss (1976) señalan la presencia de una isoforma mayoritaria (78 %) de migración anódica y de otra minoritaria (22 %) de migración catódica.

Estudios recientes, realizados por nosotros (5) señalan que la arginasa de glándula mamaria de rata en lactación es una enzima mayoritariamente citosólica, inducible y con notables diferencias físico-químicas, cinéticas, inmunológicas y de regulación con respecto a la isoenzima localizada en hígado, pudiendo evidenciar este hecho el desempeño de distintas funciones en el organismo tal y como se ha señalado anteriormente, algunas de estas características se recogen en la Figura 3.

Finalmente, es necesario hacer notar que la repercusión de la arginasa de glándula mamaria tanto sobre la síntesis de proteínas, mediante la producción de prolina y glutámico, como sobre la lactogénesis, por la producción de poliaminas, ha sido ampliamente estudiada en glándula mamaria de rata en lactación, no así en otras especies de alta producción láctea. Estas especies, que por su condición de rumiantes presentan importantes diferencias metabólicas con respecto a otros mamíferos deberán ser en el futuro objeto de estudio, para conocer el papel que la arginasa desempeña en el conjunto de procesos que se desencadenan durante la lactación.

BIBLIOGRAFIA

(1) BOND, J.S.; UNGER, D.S.; GARGANTA, C.L. (1986): Properties and regulation of mouse liver arginase. Manganese in metabolism and enzyme function. Schramm, V.L. y Wedler, F.C, Eds. Academic Press. New York. 239-257.

(2) BOR I, O.; TRAUS, B. (1976): Separation of arginase isoenzymes from human tissues by agar gel electroforesis. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **14**: 533-535.

(3) CLARK, J.H.; DERRIG, R.G.; DAVIS, C.L.; SPIRES, H.R. (1974): Metabolism of arginine and ornithine in the cow and rabbit mammary tissue. *J. Dairy Sci.* **58**: 1808-1813.

(4) FOLLEY, S.J.; GREENBAUM, A.L. (1947): Changes in the arginase and alkaline phosphatase contents of the mammary gland and liver of the rat during pregnancy, lactation and mammary involution. *Biochem. J.* **41**: 261-269.

(5) FUENTES, J.M. (1993): Tesis Doctoral. Cáceres. Universidad de Extremadura.

(6) GLASS, R.D.; KNOX, W.E. (1973): Arginase isozymes of rat mammary gland, liver and other tissues. *J. Biol. Chem.* **248**: 5785-5789.

(7) GREENGARD, O.; SAHIB, M.K.; KNOX, W.E. (1970): Developmental formation and distribution of arginase in rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **137**: 477-482.

(8) HERZFELD, A.; RAPER, S.M. (1976): The heterogeneity of arginases in rat tissues. *Biochem. J.* **153**: 469-478.

(9) JÄNNE, J.; ALHONEN, L.; LEINONEN, P. (1991): Polyamines: From molecular biology to clinical applications. *Ann. Med.* **23**: 241-259.

(10) KUNG, J.T.; BROOKS, S.B.; JAKWAY, J.B.; LEONARD, L.L.; TALMAGE, D.W. Suppresion of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. *The J. Exp. Med.* **146**: 665-672.

(11) MARLETTA, M.A. Nitric oxide: biosynthesis and

biological significance. *Trends in Biol. Sci.* **14**: 488-492.

(12) MEPHAM, T.B.; LINZELL, J.L. (1966): A quantitative assessment of the contribution of individual plasma amino acids to the synthesis of milk proteins by the goat mammary gland. *Biochem. J.* **101**: 76-83.

(13) MEPHAN, T.B.; LINCELL, J.L. (1967): Urea formation by the lactating goat mammary gland. *Nature.* **214**: 507.

(14) MEZL, V.A.; KNOX, W.E. (1977): Metabolism of arginine in lactating rat mammary gland. *Biochem. J.* **164**: 105-113.

(15) OKA, T.; PERRY, J.W. (1974): Arginase affects lactogenesis through its influence on the biosynthesis of spermidine. *Nature.* **250**: 660-661.

(16) OKA, T.; SAKAI, T.; LUNDGREN, D.W.; PERRY, J.W. (1978): Polyamines in growth and development of mammary gland. Hormones, receptor and breast cancer. McGuire, W.L., Eds. Raven Press, New York. 301-323.

(17) POJANPELTO, P.; HOLTTÄ, E. (1983): Arginase activity of different cells in tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta.* **757**: 191-195.

(18) REDDI, P.K.; KNOX, W.E.; HERZFELD, A. (1975): Types of arginase in rat tissues. *Enzyme.* **20**: 305-314.

(19) RUSSEL, D.H.; McVICKER, T.A. (1972): Polyamine biogenesis in the rat mammary gland during pregnancy and lactation. *Biochem. J.* **130**: 71-76.

(20) YIP, M.C.M.; KNOX, W.E. (1972): Function of arginase in lactating mammary gland. *Biochem. J.* **127**: 893-899.