

**Caracterización cinética de la regulación de Homocisteina y
ADMA (Asymmetric Dimethylarginine) sobre la actividad
Arginasa I y II**

Johana Andrea Betancur Echeverri

Este trabajo se presenta como requisito parcial para obtener el grado de:

Ingeniería Biomédica

Director del trabajo de grado

Vasthi López Palma

Codirectores

Sarah Röthlisberger Booth

Nini Johana Pedroza

INSTITUTO TECNOLÓGICO METROPOLITANO

Facultad de Ciencias Exactas y Aplicadas

Ingeniería Biomédica

2016

RESUMEN

La hipertensión es una enfermedad caracterizada por un deterioro progresivo y funcional que involucra la disfunción endotelial, en cuando a la producción de moléculas vasodilatadoras u Óxido Nítrico (NO)(C. Zhang et al., 2004). El NO es una molécula altamente compleja que puede ser sintetizado a partir del aminoácido semiesencial L-arginina, por dos enzimas la arginasa y la eNOS(Elms et al., 2013). La Arginasa ha sido propuesta como una enzima clave en la función del sistema cardiovascular. Alteraciones en su expresión o actividad, puede inducir a disfunción endotelial y por ende a interferir con la biosíntesis de NO, modificando de esta manera la homeostasis vascular. En las últimas décadas se ha evidenciado que ciertos factores de riesgo coronario, como la Homocisteína, déficits de estrógeno, infecciones, ADMA. entre otros, producen disfunción endotelial(Badimón & Martínez-González, 2002). (Jakovljevic, Gasic, Kovacevic, Rajkovaca, & Kovacevic, 2015). Hasta la fecha se han descrito la inhibición de la actividad eNOS por ADMA y el efecto del Hcy sobre la producción de NO(Millatt et al., 2003)(Ikeda, Ikeda, Minota, & Shimada, 1999) y su relación a patologías como hipertrigliceridemia, hiperglucemia, hipertensión, ataques cardiacos, y accidentes cerebrovasculares (Markus C Stühlinger et al., 2003)(M C Stühlinger et al., 2001)(Ito et al., 1999) (Faraci, 2003).

En este contexto, teniendo en cuenta que, tanto ADMA, como Hcy, están fuertemente relacionados y desempeñan un papel primordial en la patogénesis de enfermedades de origen cardiovascular. EL objetivo de este trabajo fue analizar la función cumple ADMA y Hcy en relación a una conjunto de enzimas llamadas las Arginasa, en sus dos isoformas (I y II). Debido a que recientemente esta familia de enzimas ha emergido como un importante regulador critico en la vía de señalización que comprende la síntesis de NO, y a su vez en la disfunción vascular. El trabajo se realizó haciendo uso de un modelo de proteína recombinante con el plásmido pBluescript KS (+) que contiene el cDNA para arginasa I y

otro para Arginasa II en la cepa de E. coli JM109 y mediante el método colorimétrico basado en la formación de urea y la α -isonitrosopropiofenona se midió actividad arginasa, la cual que tiene su máximo de absorción a 540 nm (Archibald, 1957).

Palabras clave: Arginasa, NO, ADMA y Homocisteina

AGRADECIMIENTOS

A mi papá, mi mamá, mi hermana y su esposo quienes hicieron todo lo posible por ayudarme, con tanta paciencia, comprensión y sacrificio durante todos estos años.

A mi querido Guillermo, quien fue la luz en los momentos oscuros, por su compañía, constancia e infinito amor. Gracias por tantas sonrisas.

A la profesora Sarah Rothlisberger quien me brindo toda su sabiduría, y apoyo en mi desarrollo en la investigación y por ser más que una profesora, una mentora.

A la profesora Johana Pedroza quien con su pasión por la investigación y el trabajo en el laboratorio fomento en mí el amor hacia la ciencia.

Al laboratorio de Metabolismo de Aminoácidos e hipoxia, de la Universidad Católica del Norte de Chile, quien hizo posible la realización de este trabajo. Especialmente a la Dr Vathi López y a María Isabel Taborda quienes me dieron la oportunidad de realizar esta pasantía de investigación para el desarrollo de esta tesis.

Gracias a todos

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADMA= NG-dimetil-L-arginina

BPAC =Células endoteliales de pulmón de ovino

CBS = Cistationina betasintasa

cDNA= ácido desoxirribonucleico complementario

CGL= Cistationina gammaliasa

CIHH =Hipoxia hipobárica intermitente crónica

CSE = Extracto de humo de cigarrillo CSE

DDAH =Dimethylarginine dimethylaminohydrolase

DTT = Dithiothreitol

EC=Células Endoteliales

EDTA= Acido etildiaminotetraacético

GMPc= Guanosín monofosfato cíclico, GMP_c

HAP =Hipertensión pulmonar

Hcy= Homocisteina

HHcy= Hiperhomocisteinemia

HUVEC= Células endoteliales de vena umbilical humana

IPTG =Isopropyl- β -D-thio-galactosido

KCl= Cloruro de potasio

K_d= constante de inhibición

K_M= Constante de Michaelis- menten

LB= Medio Luria

L-NMMA =NG-monometilL-arginina (L-NMMA)

MnCl₂ = Cloruro de Manganeso

NO: Óxido nítrico

NOS 3- eNOS: Enzima óxido nítrico sintetasa endotelial

NOS1= Enzima óxido nítrico sintetasa neuronal

NOS2= Enzima óxido nítrico sintetasa inducible

OAT= Enzima Ornitina aminotransferasa

OD= Absorbancia

ODC= Ornitina decarboxilasa

OMS= Organización Mundial de la Salud

ONOO-= Peroxinitrito

PMSF= Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

TB = Medio Terrific Broth

Tris-HCL= 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol – Ácido Clorhídrico.

V_{max} = Velocidad Máxima

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	2
AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	5
TABLA DE CONTENIDO	7
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
3. OBJETIVOS.....	17
a. OBJETIVO GENERAL	17
b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MARCO TEÓRICO	18
4.1 La hipertensión y endotelio	18
4.2 El Óxido Nítrico	19
4.3 Enzima Arginasa	24
4.4 ADMA (Asymmetric Dimethylarginine) y Homocisteina (Hcy).....	27
5. METODOLOGÍA	30
5.1 Descripción general de la cepa JM109 y el plásmido pBluescript	30
5.1.1 Vector.....	30
5.1.2Cepas	31
5.2 Medios de cultivo	32
5.2.1 Medio Luria (LB)	32
5.2.2Medio Terrific Broth (TB)	32
5.2.3 Placas con Medio Luria Broth o LB + Agar+ Ampicilina	32
5.2.4 Siembra de la cepa JM109 de E. coli en placas de Petri LB-Agar	32
5.3 Verificación de la existencia de las isoformas de arginasa en el plásmido pBluescript mediante PCR.....	32
5.4 Lisis Bacteriana.....	37

5.5 Purificación de las isoformas de Arginasa mediante cromatografía de intercambio iónico (DEAE Cellulose)	37
5.6 Medición de la actividad enzimática de la Arginasa II mediante Archibald, 1957	37
5.7 Estudios cinéticos para arginasa I y II.....	38
6. RESULTADOS	39
6.1 Cultivo bacteriano de la cepa JM109 de E.coli con el pBluescript KS (+) que contiene el cDNA para Arginasa I y II, e inducción mediante IPTG.	39
6.2 Lisis bacteriana.....	39
6.3 Verificación de la existencia de las Ambas isoformas de Arginasa mediante PCR.....	40
6.4 Purificación de las isoformas de Arginasa mediante cromatografía de intercambio iónico (DEAE Cellulose)	40
6.5 Medición de actividad Arginasa. Y ensayos cinéticos (curva de progreso, saturación, dosis respuesta para ADMA y Hcy).....	43
6.5.1 Ensayos para Arginasa II, Curva de progreso	43
6.5.1 Ensayos para Arginasa II, Curva de saturación.....	43
6.5.2 ADMA en Arginasa II.....	44
6.5.3 Homocisteina en Arginasa II.....	45
6.6 Ensayos para Arginasa I.....	45
6.5.1 Curva de progreso	45
6.6.2 Ensayos para Arginasa I, Curva de Saturación	46
6.6.3 ADMA en Arginasa I.....	47
6.6.4 Homocisteina en Arginasa I.....	47
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	48
8. REFERENCIAS	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Primers para Arginasa I humana. Longitud del amplicon: 356.....	33
Tabla 2. Secuencia de la Arginasa I mostrando el fragmento amplificado	33
Tabla 3. Primers para Arginasa II humana. Longitud del amplicon: 354.	34
Tabla 4. Secuencia de la Arginasa II mostrando el fragmento amplificado.....	35

LISTA DE FIGURAS

Ilustración 1. El endotelio vascular	19
Ilustración 2. Tipos de NOS	20
Ilustración 3. Biosíntesis del NO mediado por la enzima eNOS.	21
Ilustración 4. vía metabólica de la L-arginina	22
Ilustración 5. Vías metabólicas para arginasa y eNOs	23
Ilustración 6. Reacción metabólica para arginasa.	24
Ilustración 7. Mecanismo regulado para la síntesis de NO	26
Ilustración 8. Síntesis de ADMA.	28
Ilustración 9. Resumen de la metodología implementada	30
Ilustración 10. Resumen de la metodología implementada	31
Ilustración 11. plásmido pBluescript II K (+)	38
Ilustración 12. Curva de crecimiento E. coli, cepa JM109 con el inserto del plásmido pBluescript que contiene el cDNA para arginasa I y II.	39
Ilustración 13. Verificación de ambas formas de Arginasa mediante PCR TAKARA	40
Ilustración 14. Lavado para Cromatografía de intercambio iónico DEAE celulosa para Arginasa II.	41
Ilustración 15. Elución para Cromatografía de intercambio iónico DEAE celulosa para Arginasa II	41
Ilustración 16. Lavado para Cromatografía de intercambio iónico DEAE celulosa para Arginasa II	42
Ilustración 17. Curva de progreso para Arginasa II	43
Ilustración 18. Curva de saturación para Arginasa II	44
Ilustración 19. Ensayo de dosis respuesta para ADMA en arginasa II	44
Ilustración 20. Ensayo de dosis respuesta para Hcy en arginasa II	45

Ilustración 21. Curva de progreso para Arginasa I.....	46
Ilustración 22. Curva de saturación para Arginasa I	47
Ilustración 23. Ensayo de dosis respuesta para ADMA en arginasa I. I.	47
Ilustración 24. Ensayo de dosis respuesta para Hcy en arginasa I	48

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enzima arginasa es una proteína clave para el buen funcionamiento del sistema cardiovascular, existe una creciente evidencia del papel que desempeña en la disfunción vascular. Varios estudios han demostrado de forma convincente que un aumento de la actividad arginasa se asocia con disfunción endotelial. Esta alteración ha sido estudiada en varios modelos experimentales tales como la hipertensión, arterosclerosis, y diabetes (S. M. Morris, 2009).

El aumento de la expresión/actividad arginasa se observó en varios lechos vasculares en modelos de hipertensión. Estudios en células de vena umbilical humana (HUVEC) y en ratas sometidos a hipoxia muestran que hay un aumento de arginasa II, lo cual provoca una alteración en la vía L-arginina/NO en hipoxia, generando alteraciones en el endotelio y contribuyendo a la generación de hipertensión (Topal et al., 2006) (Lopez et al., 2009). En concordancia con estas investigaciones (Nagai, Imamura, Watanabe, & Azuma, en el 2008) sugieren que una sobre-regulación de la arginasa I puede promueve el deterioro del GMP cíclico lo cual aporta al desarrollo de la patología . En contraste, ha sido demostrado que inhibición de la enzima arginasa impide el desarrollo de hipertensión y mejora la función endotelial aortica a través de un mecanismo dependiente de NO (Huynh et al., 2009).

Ambas isoformas de arginasa puede actuar recíprocamente sobre la biodisponibilidad de NO, y es posible que la falta de estas enzimas promuevan alteraciones en los niveles de NO, dando como resultado un reajuste central de la presión. Un aumento de la actividad de la arginasa puede llevar a un consumo de L-arginina necesaria para la producción de NO por la eNOS y por lo tanto a la disfunción endotelial (Orozco, 2015). Teniendo en cuenta que la biodisponibilidad reducida de NO y la disfunción endotelial están críticamente involucradas en el desarrollo de varios trastornos cardiovasculares, la regulación de la actividad de la arginasa puede ser una causa subyacente importante. Sin embargo, hasta ahora la mayor parte de los estudios se han centrado en conocer los diferentes alteradores

de la expresión, actividad, y estructura de eNOS(O'Driscoll, Green, Rankin, & Taylor, 1999)(Vergnani et al., 2000), (Förstermann & Münzel, 2006) a pesar del interés creciente de la participación de la arginasa en la disfunción endotelial(Kovamees, Shemyakin, Eriksson, Angelin, & Pernow, 2015) (Pernow & Jung, 2016).

Al respecto, se ha detectado fuertes inhibidores de eNOS y uno de los más importantes hasta ahora conocido es ADMA(Sibal, Agarwal, Home, & Boger, 2010). Donde valores altos en el plasma se encuentran asociados a una disminución en la producción de NO sistémico, promoviendo patologías como aterosclerosis (Sibal et al., 2010). hipercolesterolemia, hipertensión, insuficiencia cardiaca crónica, diabetes mellitus e insuficiencia renal crónica (Kao et al., 2015).Es particularmente interesante el comportamiento de esta molécula, ya que puede conducir a la formación de otros mecanismos reguladores complejos en la síntesis de NO, como la Homocisteína, que se caracteriza fundamentalmente, por generar estrés oxidativo o especies reactivas de oxígeno, como el superóxido (X. Zhang et al., 2000).Es de gran importancia mencionar que la bioactividad de NO depende, en parte, de su interacción con las especies reactivas del oxígeno, las cuales a su vez pueden producir citotoxicidad en el endotelio (Welch et al.). Actualmente, no se ha considerado el papel de ADMA o Hcy sobre la actividad arginasa, la cual ha emergido recientemente como una enzima clave en el desarrollo de fisiopatologías de origen cardiovascular(Hwang et al., 2015)(Baranyi et al., 2015) (Villalba et al., 2016). Por tal razón es necesario realizar una búsqueda de nuevos reguladores en la ruta metaboliza que comprende el NO, con el fin de que nos permita profundizar en el origen y comportamiento de las enfermedades cardiovasculares, y que pueda ser utilizado para posteriores investigaciones y aplicaciones clínicas. Por esto, es de gran importancia saber cómo es el comportamiento cinético de esta enzima con respecto a estas moléculas.

2. JUSTIFICACIÓN

La actividad de la enzima arginasa en sus dos isoformas es de gran importancia para varios cambios patológicos asociados con las enfermedades cardiovasculares. Los efectos parecen estar asociados principalmente a través de la interferencia con la biodisponibilidad de NO mediante la limitación de la L-arginina, alterando la vasodilatación en el endotelio (Berkowitz, 2003). Estudios recientes muestran la presencia de estas enzimas en las células endoteliales de arteria coronaria humana (Beleznai, Feher, Spielvogel, Lansman, & Bagi, 2011) y animales (Thengchaisri et al., 2006) (Gao et al., 2007), en células epiteliales bovina (BCEC) (Romero et al., 2008), en células endoteliales aórticas humanas (HAEC) (Ryoo et al., 2011) (Dunn et al., 2011) y en Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (Ming et al., 2004). La localización de las enzimas arginasas en estas células no solo es un marcador de las patologías cardiovasculares sino que además contribuye a la progresión de las mismas.

En enfermedades cardiovasculares como hipertensión sistémica y pulmonar la arginasa desempeña un papel primordial, varios estudios concuerdan con que una sobre expresión de la actividad arginasa puede contribuir con un deterioro en la síntesis NO, un vasodilatador importante implicado en la hemodinámica cardiovascular mediante su acción en la regulación en la relajación del flujo y la presión sanguínea (Ungvari, Csizsar, Bagi, & Koller, 2002) (Ungvari et al., 2002) (C. R. Morris et al., 2005) (Ungvari et al., 2002) (Badimón & Martínez-González, 2006) (Huynh et al., 2009) (Johnson et al., 2015). De esta manera, la enzima arginasa puede ser un factor importante involucrado en una vía alterna que participa en el desarrollo de la disfunción endotelial y de la hipertensión.

Investigaciones experimentales han demostrado que la inhibición de la arginasa puede ayudar a disminuir el estrés oxidativo y a mejorar la función vascular, con lo cual podría ser utilizada como una estrategia terapéutica. Estudios clínicos realizados por (Shemyakin et al., 2012) evidencian que mediante la administración local del inhibidor N^w -hydroxy-nor-L-arginine a pacientes con enfermedad arterial coronaria (CAD) y la diabetes mellitus tipo 2, a través de microdialisis cutánea o mediante infusión intraarterial puede contribuir a la

disminución de la patogénesis, mediante la inhibición de la enzima arginasa, mejorando la función endotelial. En concordancia con esto (Kim et al., 2009) proponen también que al inhibir la enzima arginasa con 2 (S) amino- ácido 6-boronoheptanoico (ABH), en un modelo de ratas adultas, aumenta la elasticidad vascular, lo que genera vasodilatación dependiente del endotelio, por lo tanto los autores sugieren que la arginasa es un objetivo viable para la terapia de rigidez vascular dependiente de edad.

En este contexto, La conservación del buen funcionamiento del endotelio y del metabolismo del NO, constituye uno de los objetivos fundamentales para prevenir el desarrollo de lesiones cardíacas, de ahí, la importancia que tiene el conocimiento de las diferentes rutas metabólicas que pueden estar involucradas en la síntesis del NO. Recientemente se han estudiado inhibidores del NO, derivados de la L-arginina, el ADMA (NG, NG-dimetil-L-arginina) cuyas concentraciones elevadas en el plasma se encuentran en pacientes con enfermedades como sepsis, hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, aterosclerosis, preeclampsia y microangiopatía trombotica (Benavides Trujillo & Pinzón Tovar, 2008), postulando estas moléculas como marcadores tempranos para conocer el riesgo cardiovascular (Petrova, Manolov, Vasilev, Zlatareva, & Tzatchev, 2015). Asimismo, un grupo de científicos evidenciaron que la Homocisteína se encuentra en niveles altos en trombosis y arteroesclerosis, lo cual muestra que personas con Hiperhomocisteinemia tienen un pequeño o moderado aumento de padecer patologías vasculares (Chaava, Bukiia, & Shaburishvili, 2005). Ambas moléculas han sido fuertemente estudiadas en cuanto al papel que desempeñan con eNOS, una enzima clave para la síntesis de NO. Sin embargo y pese al rol de la arginasa en la generación de esta molécula, no se han investigado en cuanto a ambas isoformas (O'Driscoll, Green, Rankin, & Taylor, 1999) (Vergnani et al., 2000), (Förstermann & Münzel, 2006). Por tal razón, , conocer las vías de señalización, y el metabolismo regulador de la vía arginasa/NO, contribuye en gran medida a elucidar el conocimiento científico que se tiene de los mecanismos moleculares que conllevan a la patogénesis de la hipertensión, y es de gran importancia tener en cuenta que esta enfermedad presenta una gran prevalencia e incidencia según los datos estadísticos

presentados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), donde la hipertensión genera anualmente 9,4 millones de muertes, y es la causa de por lo menos el 45% de los decesos por cardiopatías (OMS,

3. OBJETIVOS

a. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la cinética de la regulación de ADMA y Homocisteina sobre la enzima Arginasa tipo I y II.

b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el tipo de inhibición de ADMA y Homocisteina sobre la actividad de la enzima Arginasa I y II

Determinar las constantes de inhibición (K_d) de ADMA y Homocisteina para la arginasa tipo I y II.

Determinar la constante de afinidad de ADMA y Homocisteina para la arginasa I y II.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 La hipertensión y endotelio

Según la Organización Mundial de la Salud, la hipertensión se genera debido a que el corazón al latir, bombea sangre hacia sus arterias y crea presión en ella, cuando mayor sea esta, más difícil será para el corazón latir (BP > 140 / <90 mmHg). En este orden de ideas, la hipertensión se caracteriza por un deterioro progresivo y funcional de la pared arterial que involucra disfunción endotelial, la rigidez aórtica y el pulso (Jeunemaitre et al., 1992). Las alteraciones en el endotelio desempeñan un rol fundamental en la patogénesis de la enfermedad, debido a que generan un desequilibrio en la producción de sustancias vasodilatadoras (Hermann, Flammer, & Lüscher, 2006).

El endotelio es el órgano vascular más grande del cuerpo humano, es una capa unicelular que cubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y conforma la pared de los capilares. En conjunto, la superficie endotelial en el ser humano se compone de aproximadamente $1 \text{ a } 6 \times 1.013$ células y pesa aproximadamente 1 kg (Cines et al., 1998). El endotelio cumple diversas funciones arteroprotectoras como la regulación de la coagulación, la trombosis, el sistema fibrinolítico, modula la actividad de las células musculares de la capa media (tono vascular/proliferación) y controla el tránsito de macromoléculas (Badimón & Martínez-González, 2002). Por otra parte, es considerado un órgano vital endocrino y paracrino, el cual produce una multitud de moléculas incluyendo hormonas, factores de crecimiento, factores de coagulación, y moléculas de adhesión (Baumgartner-Parzer & Waldhäusl, 2001).

Dentro de las características principales del endotelio encontramos que contribuye a la relajación del flujo y la presión sanguínea, ya que produce y libera sustancias vasoconstrictoras (endotelina-1, tromboxano A1, prostaglandina H2), así como también sustancias vasodilatadoras (Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF),

Prostaciclina (PG12), y óxido Nítrico (NO)), las cuales en conjunto participan en el tono vascular (Badimón & Martínez-González, 2006).(ver figura 1)

El endotelio es un tejido funcionalmente complejo, productor de múltiples agentes que afectan la vasoregulación, la cual ocurre como resultado de un desequilibrio entre la liberación de factores vasoconstrictores y vasodilatadores (Iribarra P, Germain A, Cuevas M, Faúndez G, & Valdés S, 2000). El factor vasodilatador predominante es el Óxido Nítrico (NO), el cual ha sido propuesto por varios autores como uno de los principales reguladores de los procesos homeostáticos locales, que podría clasificarse como una molécula arteroprotectora de origen endotelial(Tousoulis, Kampoli, Tentolouris, Papageorgiou, & Stefanadis, 2012). Por lo tanto, una disminución en la liberación de NO en la pared arterial, debido a una síntesis deteriorada o degradación oxidativa en exceso, es factor de riesgo para la aterosclerosis, hipertensión y la hipercolesterolemia (Cannon, 1998).

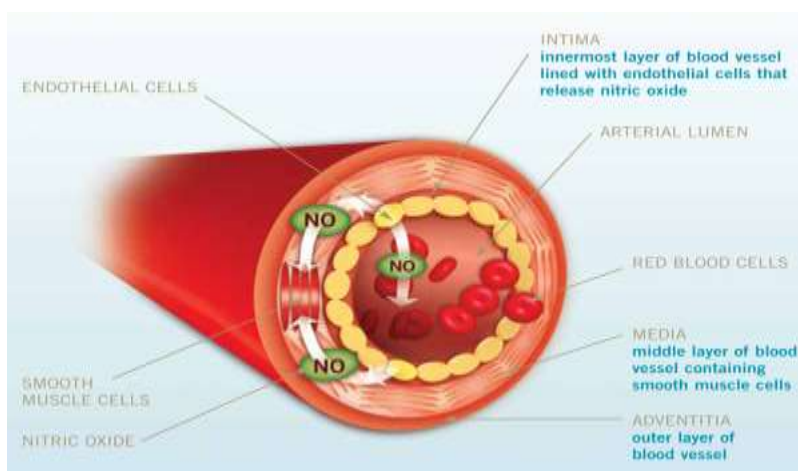


Ilustración 1. El endotelio vascular, las células endoteliales se caracterizan por formar una capa que tapiza todo el sistema cardiovascular, debido a su ubicación, actúa sobre la pared celular activando sustancias vasodilatadoras como el NO. Fuente: Aging Hearts and Arteries: A Scientific Quest | National Institute on Aging.(s.f) Recuperado de <https://www.nia.nih.gov/health/publication/aging-hearts-and-arteries/chapter-4-blood-vessels-and-aging-rest-journey>

4.2 El Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO), es identificado como un factor relajante derivado del endotelio. Es una molécula pequeña difusible, lipofílica, de corta duración (aproximadamente seis segundos). Posee diferentes propiedades actuando sobre la relajación del músculo liso, la citotoxicidad celular inmune, mecanismo de acción de agentes anestésicos y vías de nocicepción (Cannon, 1998). Se forma a partir del grupo guanidino del aminoácido semiesencial L-arginina en su conversión a L-citrulina gracias a la acción de la enzima Óxido Nítrico Sintetasa (NOS) (Tamargo et al., 2006). En mamíferos se han descrito tres isoformas de NOS, neuronal (NOS1), inducible (NOS2) y endotelial (NOS3). NOS1 y NOS3 son constitutivas y se activan por el complejo Ca^{++} y calmodulina ($Ca^{++} M$), mientras que la NOS2 es inducible, es independiente de Ca^{++} y produce NO a mayor velocidad que las otras isoformas de NOS (NOS2; 105 mmol/s, NOS1 y NOS3, 96 y 16 nmol/s, respectivamente (Nishida & Ortiz de Montellano, 1999)).

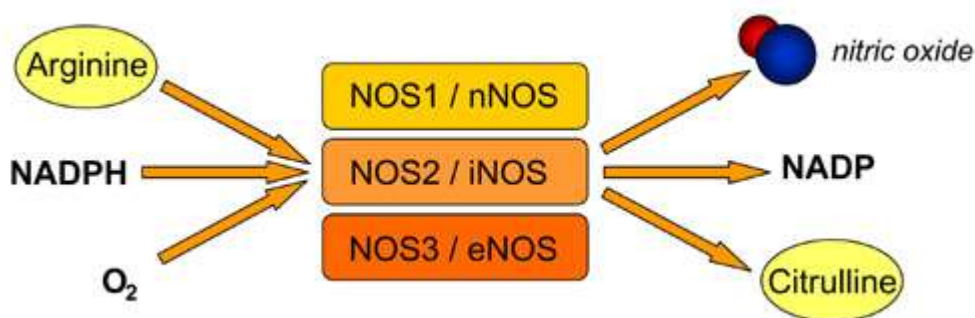


Ilustración 2. Tipos de NOS. Fuente: Nitric Oxide research group.(sf). Recuperado de: <http://www.reading.ac.uk/nitricoxide/intro/no/synthesis.htm>

Una vez sintetizado el NO por eNOS3 en el endotelio, es liberado para luego difundirse hacia las células de músculo liso vascular, donde activa la guanil ciclasa soluble produciendo un cambio conformacional uniéndose en el sitio catalítico y generando la conversión de guanosina 5 trifosfato a guanosina 3,5 monofosfato cíclica (GMPc), esta acción incrementa la concentración de GMPc celular hasta en 100 veces y reduce la

cantidad de calcio intracelular, permitiendo la relajación muscular, activando diferentes procesos biológicos, como la dilatación arterial, e inhibición de la actividad plaquetaria. Este proceso biológico es mediado por la proteína kinasa, canales iónicos y fosfodiesterasas dependiente de GMPc (Tousoulis et al., 2012) (Massion, Feron, Dessy, & Balligand, 2003) (Ver figura 2).

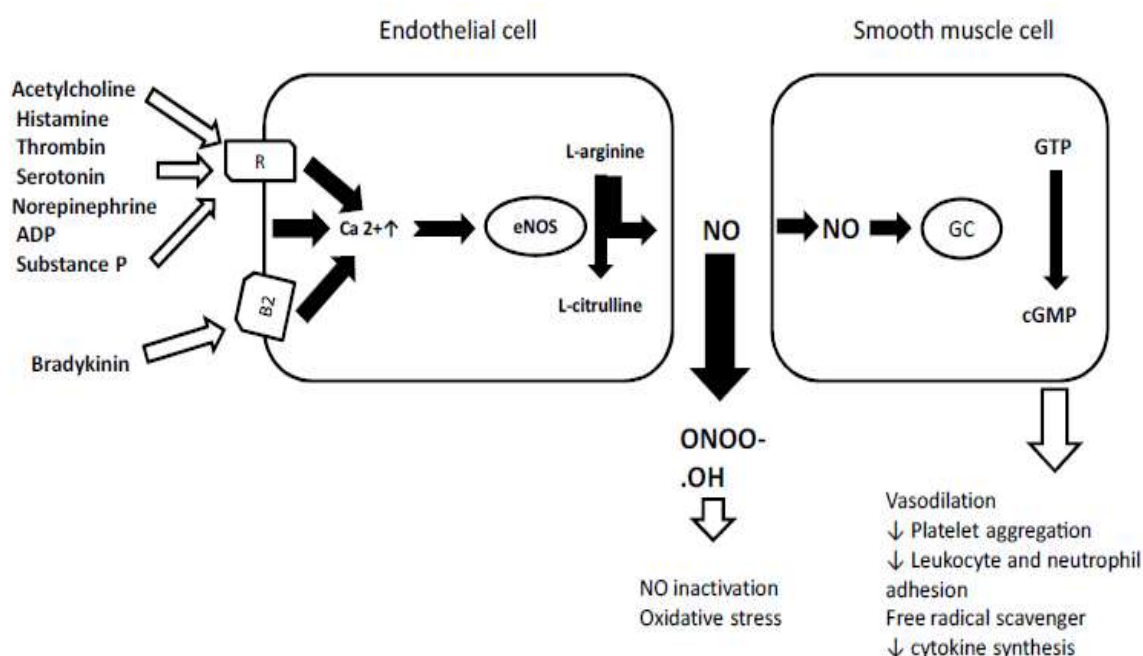


Ilustración 3. Biosíntesis del NO mediado por la enzima eNOS. B2 (bradykinin B 2 receptor), cGMP (cyclic guanosine 3',5'-monophosphate), eNOS (endothelial nitric oxide synthase), GC (guanylate cyclase), GTP (guanosine 5'-triphosphate), R (receptor), NO (nitric oxide), $\cdot OH$ (hydroxyl radical), $ONOO^-$ (peroxynitrite). Fuente: Tousoulis et al. 2012

Como se mencionó con anterioridad, el NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina. Sin embargo, este sustrato sigue diferentes rutas metabólicas en diferentes tipos celulares, dentro de las cuales involucra a la familia de enzimas Arginasa (comprendido por

la isoformas I y II). En este orden de ideas, varios autores han postulado que esta proteína podría competir con eNOS por L-arginina.

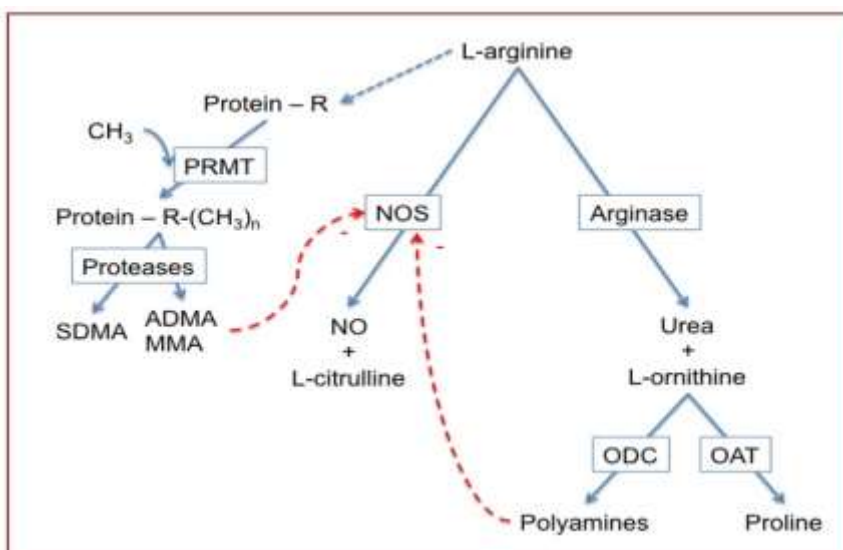


Ilustración 4. vía metabólica de la L-arginina. El aminoácido L-arginina es compartido como sustrato tanto para NOS como para Arginasa. Fuente: (Scott et al., 2014)

Una sobre expresión de arginasa en hipertensión estaría correlacionada con una alteración en la biosíntesis de NO, lo que contribuiría al desarrollo de la disfunción endotelial, y padecimiento de enfermedades cardiovasculares. Diferentes investigadores han postulado este mecanismo que involucra la vía arginasa/NO/L-arginina, la cual estaría relacionado directamente con la “paradoja de la arginina”, que describe el fenómeno por el cual se requiere de alta concentración de L-arginina extracelular para obtener la máxima liberación de NO (Elms et al., 2013). Estudios inmunohistoquímicos realizados en arteriolas coronarias de cerdos inducidos con hipertensión renovascular, sugieren que la dilatación mediada por NO de las arteriolas se inhiben en hipertensión por un aumento de la actividad arginasa, lo que limita la disponibilidad de L-arginina a eNOS para la producción de NO (C. Zhang et al., 2004).

Las concentración de L-arginina extracelular son 100–800 μM para obtener la máxima liberación de NO, muy por encima de la requerida por la actividad de eNOS, por lo cual excede enormemente la constante de Michael Menten ($K_m = 2\text{--}3 \mu\text{M}$ pH 7,5), por lo que en condiciones basales, la actividad de esta enzima estaría saturada. Por otra parte, la arginasa utiliza grandes cantidades de este sustrato ya que posee una K_m de aproximadamente 5mM a pH 7,5, logrando un gran impacto sobre eNOS. Lo anterior es posible ya que la arginasa posee un valor de V_{max} a pH fisiológico de 1400 μM por min por mg de proteína, lo cual es 1000 veces mayor que la velocidad de eNOS 1 μM por min por mg de proteína (Elms et al., 2013)(Forstermann et al., 1994). Según (McDonald, Zharikov, Block, & Kilberg, 1997) esto podría deberse a que la arginina no existe en un solo grupo distribuido homogéneamente dentro de la célula, si no que existen diversos pozos de L-arginina intracelular disponibles para cualquiera de estas enzimas.

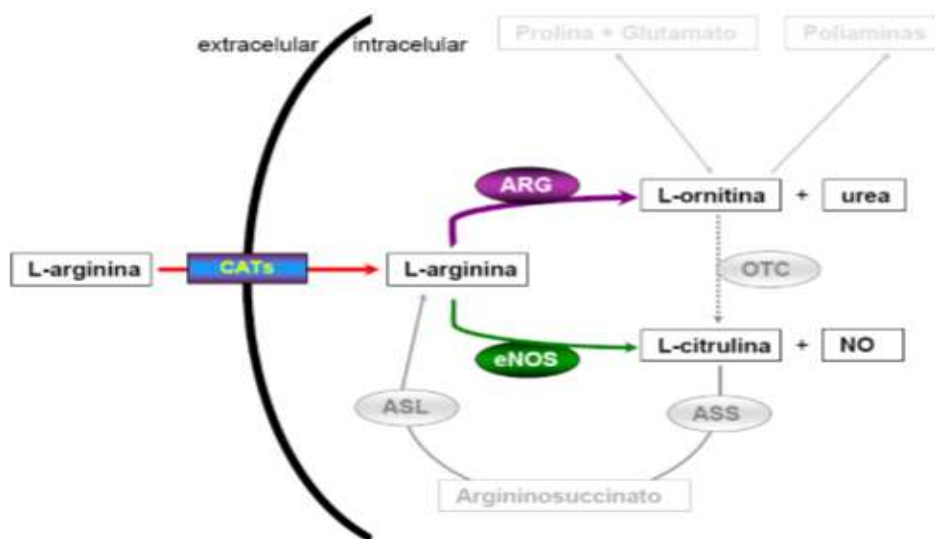


Ilustración 5. Vías metabólicas para arginasa y eNOS

Fuente: Prieto, C. (2012). Disminución de la actividad de la ruta L-arginina/óxido nítrico en hipoxia es mediada por inducción de Arginasa II vía RhoA/ROCK en células endoteliales de vena umbilical humana. Tesis de doctorado. Universidad de Concepción, Chile. Fuente: Prieto, C. (2012).

4.3 Enzima Arginasa

La enzima arginasa cataliza la hidrólisis de arginina a ornitina y urea (Vockley et al., 1996).

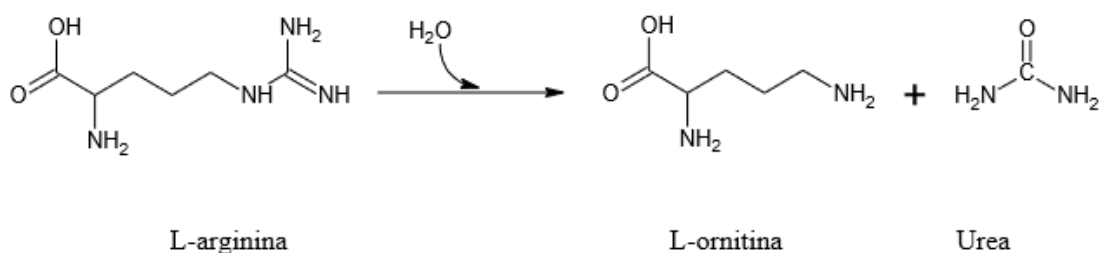


Ilustración 6. Reacción metabólica para arginasa. Fuente: (Vockley et al., 1996).

Existen dos tipos de arginasa, la isoforma I citosólica, es regulada por proteínas de la dieta (Cederbaum et al., 2004), (Bachetti et al., 2004). Esta se encuentra altamente expresada en el hígado y es caracterizada por participar en el proceso de urogénesis. Presenta un amplio espectro de actividad, actuando en la biosíntesis de poliaminas, prolina, glutamato, los cuales son vitales en la síntesis de células endoteliales, células del músculo liso y colágeno (Durante, 2013) Por otra parte, la isoforma mitocondrial o Arginasa II, se encuentra ubicada en tejidos no hepáticos tales como próstata, riñón, intestino delgado, y glándulas mamarias (Gotoh et al., 1996). Ambas proteínas existen como homotrímeros y cada monómero presenta un peso molecular de aproximadamente 35-37 KDa para Arginasa I y 37 a 40 KDa para Arginasa II, cuentan con un pH óptimo de 9.0 a 9.5 en homo sapiens y requieren de un catión bivalente, especialmente Mn^{2+} para su acción catalítica. (Zakalskiy et al., 2012)(Peters et al., 2013). Ambas arginasas han sido ampliamente caracterizadas, la actividad de la arginasa de hígado de ratas es aproximadamente 30 veces mayor que la de riñón(Kaysen & Strecker, 1973).

Diferentes estudios se han llevado a cabo para comprender la función de ambos tipos de arginasa. La arginasa II ha emergido recientemente como un regulador crítico en la síntesis de óxido nítrico, por lo que se le considera un potente biomarcador en alteraciones del músculo liso dependientes de NO, incluyendo enfermedades vasculares, asma y disfunción eréctil (Christianson, 2004). Asimismo, la enzima arginasa puede desempeñar un papel fundamental en la regulación de la síntesis de NO, mediante la modulación de la biodisponibilidad de la L-arginina (Durante, 2013). Estudios realizados por (Topal et al., 2006) reportan por primera vez la sobre-expresión de esta enzima en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), determinado de esta manera que un aumento de actividad arginasa, principalmente de la isoforma II conllevan a una reducción de la enzima eNOS lo que provoca una alteración en la vía L-arginina/NO en hipoxia, lo cual podría vincularse a la disfunción vascular. De igual forma en el 2009 se realizó un estudio con ratas wistar sometidos a un modelo de hipoxia hipobárica intermitente crónica (CIHH fue simulada en una cámara hipobárica a 428 torr que equivale a una altitud de 4600m). La investigación muestra que aproximadamente el 30% de los animales mueren durante los primeros días que son sometidos a la cámara, demostrando de esta manera diferencias moleculares, hematológicas y cardiovasculares de las ratas intolerantes con respecto a las tolerantes o control. El grupo de ratas intolerantes se caracteriza por presentar pérdida del 30% del peso corporal, hipertensión y aumento de los hematocritos. Las respuestas asociadas a hipertensión fueron relacionadas a un incremento de la expresión de la arginasa tipo II, esta sobre expresión puede resultar de bajas concentraciones de L-arginina intracelular, lo que conlleva a alterar la biodisponibilidad de NO (Lopez et al., 2009) (ver figura 4).

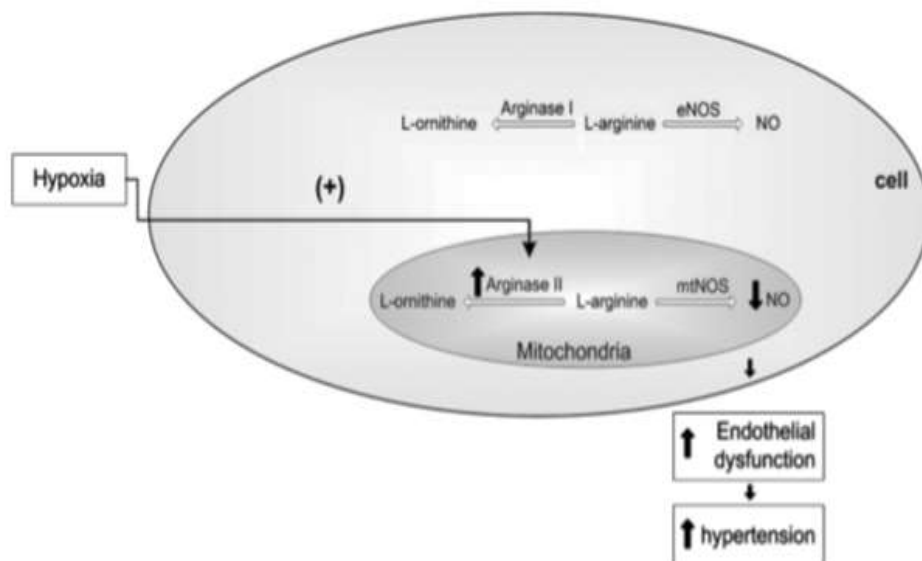


Ilustración 7. Mecanismo regulado para la síntesis de NO, mediado por la enzima arginasa II. Fuente: (Lopez et al., 2009)

En este mismo orden de ideas Nagai, Imamura, Watanabe, & Azuma, en el 2008, realizaron un estudio con el fin de dilucidar si los cambios en la actividad y expresión de las proteínas arginasa I y II, en la producción de NO están involucrados en la aceleración de la hiperplasia de la íntima en arterias carótidas de conejo, después de la administración de extracto de humo de cigarrillo (CSE). Los resultados dan a conocer una sobre expresión de arginasa I y un aumento en la producción de GMP cíclico. Un deterioro en la producción de GMP cíclico en la arteria reflejaría un deterioro aumentada de la producción de NO en las células endoteliales, lo que lleva a la aceleración de la hiperplasia de la íntima con CSE. En contraste, un reporte realizado por (Bagnost et al., 2008), sugieren que la inhibición de la Arginasa reduce la presión arterial sistémica en ratas adultas hipertensas, lo cual convierte a esta isoenzima en un objetivo potencial para el tratamiento de patologías cardiovasculares.

La arginasa es propuesta como una metaloenzima considerada una diana farmacéutica para el tratamiento de enfermedades asociadas con la homeostasis de L-arginina, como cardiovasculares y la disfunción eréctil (Ganz, 2005). En la literatura se han reportados un

gran número de inhibidores y activadores análogos al sustrato, que podrían estar afectando el cambio conformacional de la enzima. (Schnorr et al., 2008) realizaron una investigación donde correlacionaban la disminución de la actividad de la arginasa endotelial, y eritrocitos humanos tras el consumo de bebidas rica en flavanoles. Asimismo, pruebas in vitro muestran la capacidad inhibidora de la cloroquina sobre la actividad de arginasa en los eritrocitos falciformes, la cual puede desempeñar un papel primordial en exacerbación de la hipertensión pulmonar (Iyamu, Ekekezie, & Woods, 2007). En HUVEC también fueron probados la trombina y fibrina expuestos durante 4 horas con el fin de determinar la actividad arginasa. La trombina causó un aumento de 1,6 veces de la actividad arginasa en comparación con los que en los controles y la fibrina no tuvo ningún efecto, lo que sugiere disfunción endotelial por trombosis arterial aguda (Yang et al., 2006). Estos inhibidores han sido responsables de una regulación recíproca entre la vía catabólica de L-arginina mediada por la arginasa y la síntesis de óxido nítrico, lo cual ha estimulado la búsqueda de nuevos reguladores alostericos específicos de la enzima. Por esto, planteamos que tanto ADMA y Homocisteína podrían regular la vía arginasa/ óxido nítrico.

4.4 ADMA (Asymmetric Dimethylarginine) y Homocisteína (Hcy)

ADMA es un inhibidor endógeno competitivo de la síntesis de NO, debido a que compete directamente con la L-arginina por el sitio activo de eNOS, interfiriendo de esta manera con el transporte de L-arginina a las células (Kao et al., 2015). ADMA es catalizado por un grupo de enzimas denominado S-adenosilmetionina N-metiltransferasas (proteínmetilasas I y II), donde se transfiere uno o dos grupos metilos a residuos de L-arginina. Dependiendo del número de metilos transferidos, se obtiene uno o más derivados arginínicos: NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) y NG-dimetil-L-arginina (ADMA). Ambos son de origen natural, pero las concentraciones de ADMA en la circulación humana son 10 veces más que las de L-NMMA (P. Chen, Tsai, Berka, & Wu, 1996). La degradación enzimática de ADMA se genera por DDAH (dimethylarginine dimethylaminohydrolase), que pasa a ser dimetilamina y L-citrulina, posteriormente excretada por la vía renal (Boger, 2004).

Estudios han demostrado que el aumento de las concentraciones de ADMA están asociados a un incremento de la enzima eNOS en pacientes con HAP (hipertensión pulmonar), demostrando una correlación negativa significativa entre la actividad de la enzima DDAH pulmonar y las concentraciones en el plasma de ADMA, indicando que la reducción de DDAH influye directamente en las concentraciones de este inhibidor endógeno (P. Chen et al., 1996) (Pullamsetti et al., 2005).

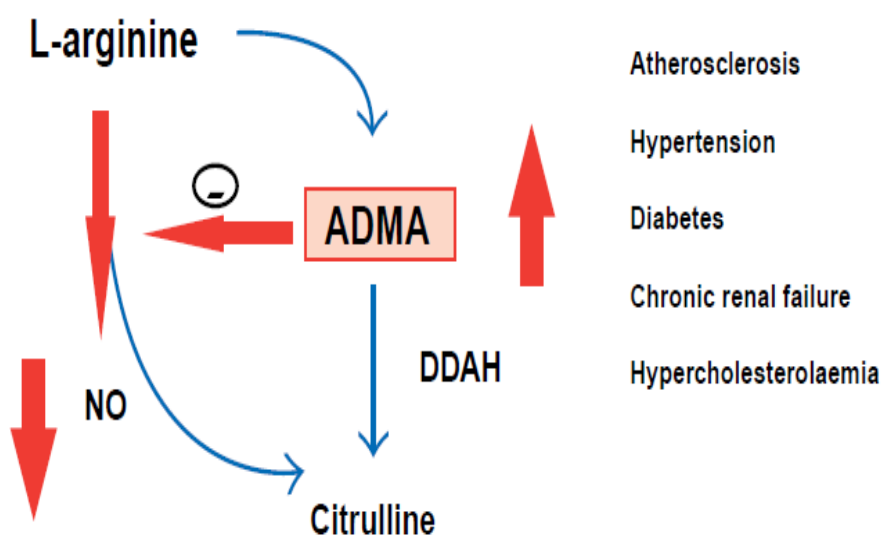


Ilustración 8. Síntesis de ADMA. Dimetilarginina asimétrica (ADMA) es sintetizada a partir de L-arginina por proteína metilasa I, posteriormente metabolizada por (DDAH) produciendo citrulina. ADMA actúa como un inhibidor endógeno de la síntesis de óxido nítrico (NO), su concentración aumenta en ciertos estados de enfermedad, posiblemente como resultado de las acciones DDAH disminuidas. Fuente: (Vallance, 2001)

Por otra parte, la Homocisteína es un aminoácido que contiene un tiol que se forma cuando la metionina se convierte en cisteína (Ikeda et al., 1999). HCY se exporta en el plasma, donde circula principalmente de forma oxidada, es metabolizada a cisteína por vía transulfuración o remetilada a metionina, mediante la enzima metionina sintetasa (Jakovljevic et al., 2015). Una vez sintetizada, la HCY puede seguir varias rutas metabólicas dentro del organismo: la ruta de transulfuración, la ruta de remetilación y la excreción por la orina. La

Hcy sigue el camino de transulfuración cuando existe un exceso de metionina o cuando se requiere la síntesis de cisteína. En esta vía, la Hcy se condensa con una molécula de serina para formar cistationina en una reacción catalizada por la cistationina betasintasa (CBS), que utiliza la vitamina B6 como cofactor. A continuación, la cistationina gammaliasa (CGL) con la ayuda de nuevo de la vitamina B6 cataliza la hidrólisis de cistationina para dar lugar al alfacetobutirato y la cisteína (Nuño-Ayala et al., 2010)(Fowler, 2005)

Cuando esta reacción se ve alterada, incremento en los niveles Hcy son asociados a patologías cardiovasculares, en el caso de hiperhomocisteinemia que se encuentra altamente implicada en la trombosis vascular y desarrollo de arterosclerosis y diferentes patologías de origen endotelial (Liu, Lin, Ju, Chu, & Zhang, 2015). Estudios realizados por (Hofmann et al., 2001) en ratones apoE-null inducidos con hiperhomocisteinemia (HHCY), con una dieta enriquecida en metionina, y poco ácido fólico y vitaminas B6 y B12, muestran un aumento de lesión aterosclerótica en el seno aórtico en los animales. Por otro lado, varios investigadores sugieren que el incremento del estrés oxidativo y de los niveles de especies reactivas de oxígeno desempeña un papel importante en los cambios vasculares producidos en una situación de HHCY (Welch et al.). En relación a la función endotelial, la bioactividad de NO, depende en gran parte, de su interacción con especies reactivas de oxígeno, y en particular con superóxido, el NO con el peróxido genera peroxinitrito (ONOO-), un potente oxidante. Tanto el superóxido como el peroxinitrito se encuentran elevados en HHCY(Faraci, 2003). En este orden de ideas, diferentes estudios han sugerido que la síntesis de NO en el endotelio se ven disminuidas por Hcy debido a que se genera un desbalance de electrones, (Faraci, 2003)(Starkebaum & Harlan, 1986).

Tanto Homocisteina como ADMA se encuentran directamente relacionadas, ya que las concentraciones plasmáticas de Hcy dependen de las concentraciones de ADMA, debido a que forma parte del reclutamiento de la metionina al actuar como donadores de grupos metilo (ácido fólico o B9) y cofactores (B6 y B12).Es decir, por cada dos moléculas de Homocisteina existe una de Dimetilarginina asimétrica. De esta manera, las vías metabólicas de estas moléculas están estrechamente relacionadas(Nuño-Ayala et al., 2010).

Se observan niveles plasmáticos elevados de ADMA en primates con HHCY. En pacientes sanos, los niveles de ADMA aumentan rápidamente después de una sobrecarga de metionina y se correlacionan con una alterada vasodilatación dependiente del endotelio (Böger, Lentz, Bode-Böger, Knapp, & Haynes, 2001).

5. METODOLOGÍA

La metodología usada en este trabajo se resume en la Figura 9 y se describe a continuación.

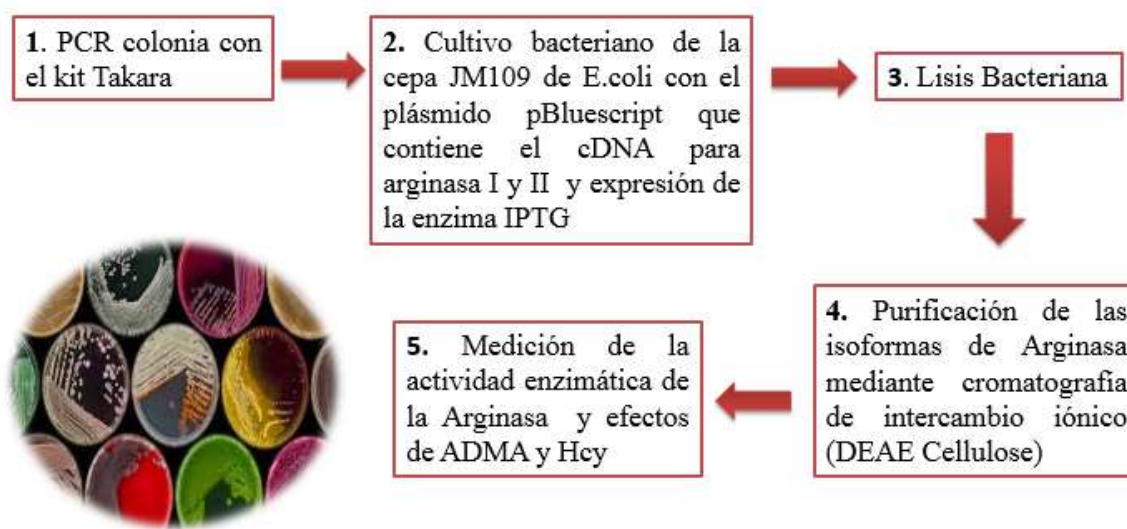


Ilustración 9. Resumen de la metodología implementada

5.1 Descripción general de la cepa JM109 y el plásmido pBluescript

5.1.1 Vector.

El plásmido pBluescript KS (+) se utilizó por tener inserto el gen que expresa a la enzima Arginasa I y II (cedido por el Dr. Stephen Cederbaum, UCLA, Los Angeles). Se encuentra en la familia de los fagémido (combinación entre plásmido y fago), las principales características del vector son resistencia a la ampicilina, contiene 21 sitios únicos de reconocimiento de enzimas de restricción, tiene áreas de clonación múltiples insertados en el gen lacZ, por lo que los clones con el inserto pueden distinguirse por una tinción azul

haciendo uso de Xgal o inducidos mediante IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactosido). Ha sido objeto de numerosas investigaciones, en el caso de los estudios realizados por (Carvajal et al., 2004) donde hicieron uso plásmido pBluescript II K (+) que contiene el cDNA de la arginasa de hígado humano. Asimismo, (López et al., 2005) hizo uso del pBluescript KS (+) en sus estudios sobre la interacción de la arginasa II con sustrato e iones de manganeso.

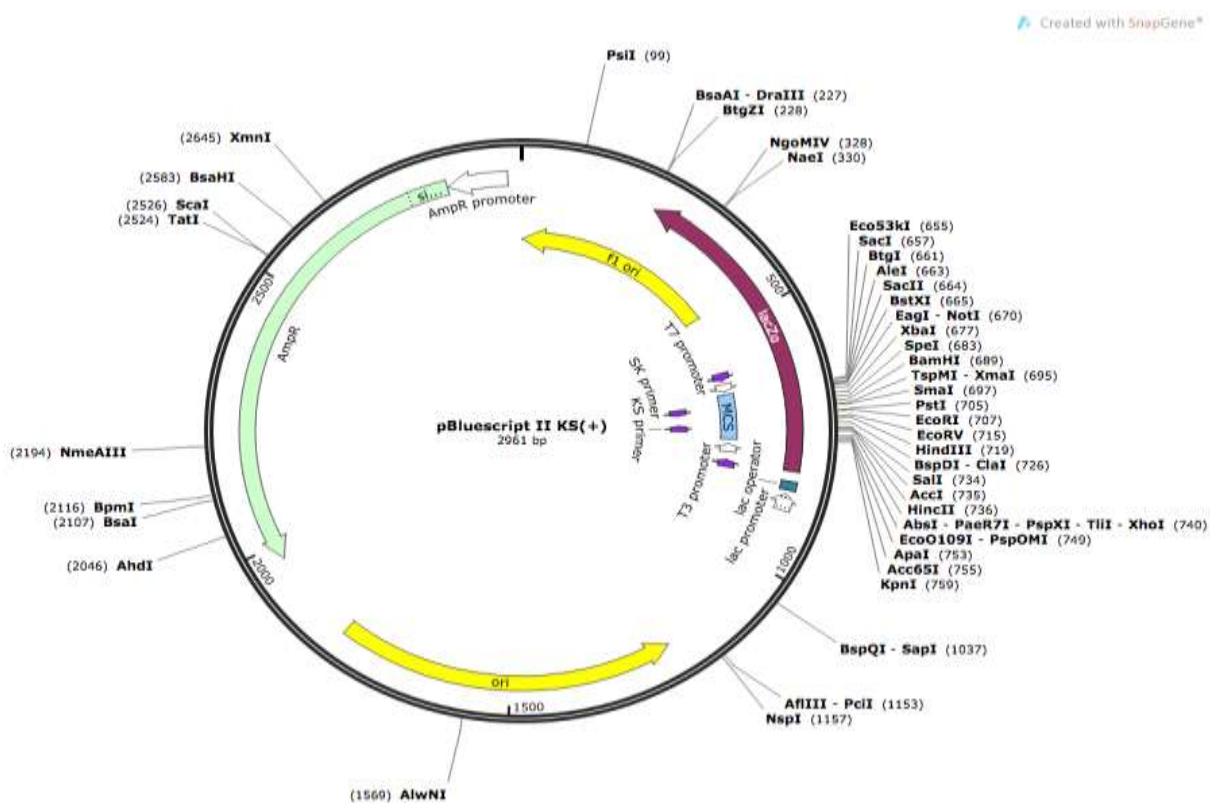


Ilustración 10. plásmido pBluescript II K (+). Fuente: SnapGene. (S, f). Recuperado de [https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/image_consortium_plasmids/pBluescript_KS\(+\)/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/image_consortium_plasmids/pBluescript_KS(+)/)

5.1.2 Cepas

Para este estudio se usó la cepa de E. coli JM109, cuyo genotipo es recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi^{''} (lac-proAB) F', [tra D36 pro AB+ lacI^q lacZ^{''}M15]. Es una

cepa no patógena, no produce arginasa endógena y ha sido ampliamente estudiada en investigaciones con proteína recombinante, inducidas con IPTG.

5.2 Medios de cultivo

5.2.1 Medio Luria (LB) se preparó usando 10g por 1L de Bactotryptona, 5g por 1l de extracto de levadura, 5g por 1l de agar (para hacer placas), con posterior autoclavado, y posteriormente se agregó ampicilina 1 µl/ml a una concentración de 100µg/ml.

5.2.2 Medio Terrific Broth (TB) se preparó para 1L con 900 mL agua bidestilada, 12 gr Bactotryptona, 24 gr de extracto de levadura, 4 mL de glicerol y 100 ml de una solución amortiguadora de 0.17 M de KH_2PO_4 , 0.72 M K_2HPO_4 (la solución amortiguadora se autoclavó por separado al medio) y posteriormente se agregó ampicilina 1 µl/ml a una concentración de 100µg/ml

5.2.3 Placas con Medio Luria Broth o LB + Agar+ Ampicilina,

Las placas LB- agar se prepararon con medio LB en placas Petri de 90mm x15 mm

5.2.4 Siembra de la cepa JM109 de E. coli en placas de Petri LB-Agar

En las placas Petri de LB-Agar +ampicilina se procedió a realizar la siembra de la cepa JM109 de E. coli. Para este procedimiento se tomaran 10ul del glicerol stock de las colonias con las isoformas de Arginasa y se hizo el rayado haciendo uso de un asa bacteriológica o de anillo. Finalmente, se incubaron 24 horas hasta que se observó un buen número de colonias.

5.3 Verificación de la existencia de las isoformas de arginasa en el plásmido pBluescript mediante PCR

Para comprobar que las colonias si estaban expresando las enzimas Arginasa I o II se realizó PCR usando el kit TAKARA SapphireAmp® Fast PCR Master Mix siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, se agregaron los componentes del kit (SapphireAmp Fast PCR Master Mix 25 µl, Forward Primer and Reverse Primer 0.2 µM (final concentration), dH₂O to 50 µl) y se adicionó una colonia de E. coli (con el inserto de

Arginasa I o II). Posteriormente, se realizó el ciclo termal (Initial denaturation: 94°C, 1 min, Amplification: 98°C, 5 sec 55°C, 5 sec 72°C 10 sec/kb* for 30 cycles). Finalmente se realizó un gel de Agarosa al 1.5% en buffer TB al 0.5X y bromuro de etidio a una concentración 0.7 µg/m, corrido a un voltaje constante de 90V por 70 minutos. Como patrones para estimar el tamaño de los fragmentos de DNA, se usó un marcador de DNA 1000 pb. La confirmación de DNA en los geles fue realizada mediante visualización por transiluminador UV.

A continuación en las Tablas 1,1.1 y 2, 2.1 se presentan los primers usados y la secuencia amplificada con el PCR tanto para Arginasa I como para Arginasa II.

Tabla 1. Primers para Arginasa I humana. Longitud del amplicon: 356

		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward (Sense)	CTGGGTGACTCCCTGTATATCT	592	614	22	62	50
Reverse (Antisense)	GGGATGGGTTCACTTCCATTAT	926	948	22	62	45.5

Tabla 2. Secuencia de la Arginasa I mostrando el fragmento amplificado

Base	Sequence
1	GGAAAAAAAAAGATGCGCCCTCTGTCACTGAGGGTTGACTGACTGGAGAGCTCAAGTGCAGCAA AGAGAAGTGTGAGAGCATGAGCGCCAAGTCCAGAACC
101	ATAGGGATTATTGGAGCTCCTTTCTCAAAGGGACAGCCACGAGGAGGGTGGGAAGAAGGCCCT ACAGTATTGAGAAAGGCTGGTCTGCTTGAGAACTTA
201	AAGAACAAGTAACTCAAACTTTTTAATTTTAGAGTGTGATGTGAAGGATTATGGGGACCTGCC CTTTGCTGACATCCCTAATGACAGTCCCTTTCAAAT
301	TGTGAAGAATCCAAGGTCTGTGGGAAAAGCAAGCGAGCAGCTGGCTGGCAAGGTGGCAGAAG TCAAGAAGAACGGAAGAATCAGCCTGGTCTGGGCGGA

401	GACCACAGTTTGGCAATTGGAAGCATCTCTGGCCATGCCAGGGTCCACCCTGATCTTGGAGTCA TCTGGGTGGATGCTCACACTGATATCAACTCCAC		
501	TGACAACCACAAGTGGAACTTGCATGGACAACCTGTATCTTTCTCCTGAAGGAACTAAAAGGAAAGATT		
601	<u>TCCCTGTATATCT</u>	GCCAAGGATATTGTGTATATTGGCTTGAGAGACGTGGACCCTGGGGAACACTTACATT	
701	ATGACTGAAGTGGACAGACTAGGAATTGGCAAGGTGATGGAAGAACTCAGCTATCTACTA GGAAGAAAGAAAAGGCCAATTCATCTAAGTTTTGATG		
801	TTGACGGACTGGACCCATCTTTCACACCAGCTACTGGCACACCAGTCGTGGGAGGTCTGACATA CAGAGAAGGTCTCTACATCACAGAAGAAATCTACAA		
901	AACAGGGCTACTCTCAGGATTAGAT	<u>ATAATGGAAGTGAACCCATCCC</u>	TGGGGAAGACACCAGAAGA
1001	ACCTTGGCTTGTTTCGGACTTGCTCGGGAGGGTAATACAAGCCTATTGACTACCTTAACCCAC CTAAGTAAATGTGGAAACATCCGATATAAATCTCAT		
1101	AGTTAATGGCATAATTAGAAAGCTAATCATTTTCTTAAGCATAGAGTTATCCTTCTAAAGACTT GTTCTTTCAGAAAAATGTTTTTCCAATTAGTATAAA		
1201	CTCTACAAATTCCTCTTGGTGTAATAATCAAGATGTGGAAATTCTAACTTTTTTGAAATTTAAA AGCTTATATTTTCTAACTTGGCAAAAGACTTATCC		
1301	TTAGAAAGAGAAGTGTACATTGATTTCCAATTAATAATTTGCTGGCATTAAAAATAAGCACACT TACATAAGCCCCATACATAGAGTGGGACTCTTGGA		
1401	ATCAGGAGACAAAGCTACCACATGTGGAAAGTACTATGTGTCCATGTCATTCAAAAAATGTG ATTTTTATAATAAACTCTTTATAACAAGATTAATAAA		

Tabla 3. Primers para Arginasa II humana. Longitud del amplicon: 354.

		Start	Stop	Length	Tm	GC%

Forward (Sense)	CATGGACAGCCAGTTTCATTTTC	594	616	22	62	45.5
Reverse (Antisense)	CATGCCTTCTCGATAGGTTAGTC	925	948	23	62	47.8

Tabla 4. Secuencia de la Arginasa II mostrando el fragmento amplificado

Base	Sequence
1	CACGGGGCGGGCGGACGCTGGCGCGGGTAGGTAAGAGCAGCGGGCGGGCGGTGGCGCTCACTC CCGGCTTCCAACCGCGCGGAGCCTCTGCCTTGGAGATT
101	CTCAGTGCTGCGGATCATGTCCCTAAGGGGCAGCCTCTCGCGTCTCCTCCAGACGCGAGTGCAT TCCATCCTGAAGAAATCCGTCCACTCCGTGGCTGTG
201	ATAGGAGCCCCGTTCTCACAAGGGCAGAAAAGAAAAGGAGTGGAGCATGGTCCCGCTGCCATA AGAGAAGCTGGCTTGATGAAAAGGCTCTCCAGTTTGG
301	GCTGCCACCTAAAAGACTTTGGAGATTTGAGTTTTACTCCAGTCCCCAAAGATGATCTCTACAA CAACCTGATAGTGAATCCACGCTCAGTGGGTCTTGC
401	CAACCAGGAAGTGGCTGAGGTGGTTAGCAGAGCTGTGTCAGATGGCTACAGCTGTGTCACACT GGGAGGAGACCACAGCCTGGCAATCGGTACCATTAGT
501	GGCCATGCCCAGACTGCCAGACCTTTGTGTTGTCTGGGTTGATGCCATGCTGACATCAACACACCCCTT CTC
601	<u>AGCCAGTTTCATT</u> TCCTCAGAGAACTACAGGATAAGGTACCACAACCTCCAGGATTTTCTGGATCAAAC <u>TC</u> GTA
701	TATTGGTCTGAGAGACGTGGACCCTCCTGAACATTTTATTTTAAAGAACTATGATATCCAGTATT TTCCATGAGAGATATTGATCGACTTGGTATCCAG
801	AAGGTCATGGAACGAACATTTGATCTGCTGATTGGCAAGAGACAAAGACCAATCCATTTGAGT TTTGATATTGATGCATTTGACCCTACACTGGCTCCAG
901	CCACAGGAACTCCTGTTGTCGGG <u>GACTAACCTATCGAGAAGGCAT</u> TATATTGCTGAGGAAATACACAAT

	G	<u>G</u>	GT
1001	TGAAGTCAATCCTCAGTTGGCCACCTCAGAGGAAGAGGCGAAGACTACAGCTAACCTGGCAGT AGATGTGATTGCTTCAAGCTTTGGTCAGACAAGAGAA		
1101	GGAGGGCATATTGTCTATGACCAACTTCCTACTCCCAGTTCACCAGATGAATCAGAAAATCAAG CACGTGTGAGAATTTAGGAGACACTGTGCACTGACA		
1201	TGTTTCACAACAGGCATTCCAGAATTATGAGGCATTGAGGGGATAGATGAATACTAAATGGTTG TCTGGGTCAATACTGCCTTAATGAGAACATTTACAC		
1301	ATTCTCACAATTGTAAAGTTTCCCCTCTATTTTGGTGACCAATACTACTGTAAATGTATTTGGTT TTTTGCAGTTCACAGGGTATTAATATGCTACAGTA		
1401	CTATGTAAATTTAAAGAAGTCATAAACAGCATTTATTACCTTGGTATATCATACTGGTCTTGTTG CTGTTGTTCCCTTCACATTTAAGTGGTTTTTCATCT		
1501	TTCCTCCCTCCTCCACAGCCTGGCTATACAGTGCATCCTTGAAGTGCAGCCACAGCAGCAA TATGCTTATTCTATCCACATCCCTAACATCATGCAT		
1601	TCACAAGGTCAAAGTTCTGGTCCACAAACCCTTCCCTATAGAAGTTCAATGGCTGCGAAAGAAT TTGTAGTAAACCAGGCCTCCCAGGATGGCGAGCTCC		
1701	AGTAAGATGATAATGGAAAGCAGCAGCTTGTGGTTGTCCTACTACAAAGAGAAGCAAAGTGG GGAGTAGTCAGAAGTTTGGATAACCTTCCTTCTAAAC		
1801	ATTTTGGGGTTAGACCTGGGACCACGGCTGGATACTCTGAGGCTGTATGTTTGATCACACAGCC ACTTAGCAGGAAGTACTCATAAGGTTCTTTAGCTGT		
1901	CACTTAGGGATAAACTGTCTACCTCACAGAAATGTTAAACTGAGACAATAAAAACCAAAGCA TAAAAATGGATTCTGAAA		

5.3 Cultivo bacteriano de la cepa JM109 de E.coli e inducción de expresión de la enzima (Arginasa I o II)

Se realizó un inóculo con 5ml de medio TB estéril, y 10ul del glicerol stock de las colonias. Se dejará incubando en agitación durante 12 horas a una velocidad de 200 rpm a 37 °C,

hasta obtener saturación de bacterias, para realizar el pase a matraces y cultivar por litros (1ml del inóculo por litro). El cultivo en matraces se dejó incubando a 37 °C a una velocidad de 150 rpm y al alcanzar una densidad óptica de 0.2 – 0.3 se indujo la expresión de la enzima, haciendo uso del reactivo IPTG (isopropil β-Dgalactopiranosido) a una concentración de 1mM. IPTG es un análogo de la galactosa que no es metabolizable e inactiva el represor lac para inducir la síntesis de β-galactosidasa en E. coli. Posteriormente de ser agregado el IPTG se dejó incubando a 30°C por 8 horas y se centrifugó a 5000rpm por 10 min a 4 °C para recolectar las células.

5.4 Lisis Bacteriana

El pellet resultante de la centrifugación anterior se lavó en un buffer (Tris-HCL 50mM pH 7,5, KCl 100mM, MnCl₂ 5mM, PMSF 0,1 mM, DTT 2mM, EDTA 1mM), y posteriormente se hizo lisis celular con un sonicador de vástago con 5 pulsaciones de 10 minutos cada una y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4 °C.

5.5 Purificación de las isoformas de Arginasa mediante cromatografía de intercambio iónico (DEAE Cellulose)

Para la purificación de la Arginasa I y II del lisado celular se empleó cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-celulosa. Esta se activó con un buffer de HCl 0.1M, NaOH0.1M y Tris 20mM pH 7.5. Se equilibró y realizó el lavado con Tris 20mM pH 7.5, y la elución con sales de KCl 250 Mm +Tris 20mM a pH 7,5. Posteriormente se tomaron fracciones de 5ml cada una y se procedió realizar ensayos de actividad Arginasa mediante el método (Archibald, 1957).

5.6 Medición de la actividad enzimática de la Arginasa II mediante Archibald, 1957

La medición de la actividad de ambas isoformas de arginasa se realizó mediante el método colorimétrico basado en la formación de urea y la α-isonitrosopropiofenona, que tiene su máximo de absorción a 540 nm. A continuación se presenta el protocolo para medir actividad Arginasa:

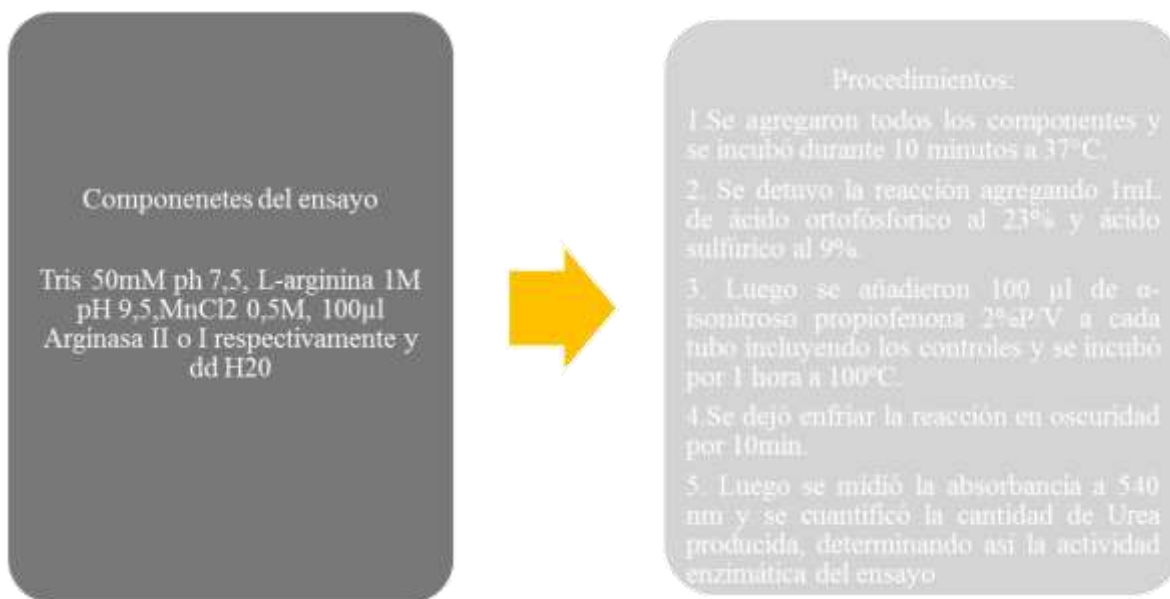


Ilustración 11. Procedimiento para medir actividad Arginasa

5.7 Estudios cinéticos para arginasa I y II

Con el fin de determinar qué tipo de inhibición, la constante de inhibición, y la constante de afinidad de ADMA y Homocisteina sobre la actividad de la enzima Arginasa II, y I, se realizaron curvas de progreso, saturación y dosis respuesta. Para realizar la curva de progreso para Arginasa II y I se hizo uso de 100 µl de Arginasa, MnCl₂ 0.5M, Tris 50mM y L-arginina 100mM-pH 7,5. Para la isoforma II, se realizó una incubación en un intervalo de tiempo de 80 minutos y para la isoforma I durante 30 minutos, parando la reacción cada 5 minutos con 1mL de ácido ortofósforico al 23% y ácido sulfúrico al 9%. Posteriormente, se realizó la curva de saturación para Arginasa II con 100 µl de Arginasa, MnCl₂ 0.5M, Tris 50mM, y L-arginina 200mM, 180mM, 160mM, 140mM, 120mM, 100mM, 80mM, 60mM, 40mM, 20mM, 10mM, 5mM, 2,5mM a -pH 7,5 y para Arginasa I, las concentraciones de L-arginina fueron de 100mM, 80mM, 60mM, 40mM, 20mM, 10mM, 5mM, 2,5mM. El tiempo de incubación se realizó según la curva de progreso (Para la isoforma II de 30 minutos y para la Isoforma I de 10 minutos). Finalmente se midieron los efectos de ADMA y Hcy sobre la enzima Actividad Arginasa en ambas isoformas con Tris

50mM y el valor de concentración de L-arginina -pH 7,5 según resultados de la curva de saturación (para Arginasa II de 50mM de y para Arginasa I de 11mM). Por otra parte, los valores de ADMA son de 0.5 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 6 μ M, 8 μ M, 10 μ M y para Homocisteina serán de 0,5 μ M hasta 80 μ M. Ver figura 11.

6. RESULTADOS

6.1 Cultivo bacteriano de la cepa JM109 de E.coli con el pBluescript KS (+) que contiene el cDNA para Arginasa I y II, e inducción mediante IPTG.

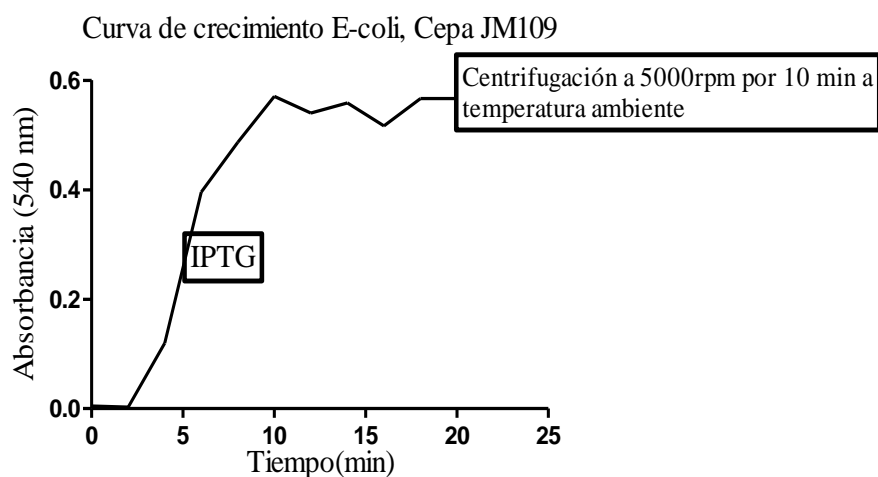


Ilustración 12. Curva de crecimiento E. coli, cepa JM109 con el inserto del plásmido pBluescript que contiene el cDNA para arginasa I y II, se midió absorbancia cada dos horas a una O.D de 600nm. Cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 0.2-0.3 se indujo expresión con el reactivo IPTG (isopropil β -Dgalactopiranosido) a una concentración de 1mM. Finalmente, pasadas 10 horas se realizó el proceso de centrifugación a 5000rpm por 10 min a temperatura ambiente.

6.2 Lisis bacteriana

El procedimiento de homogenización con el buffer (Tris-HCL 50mM pH 7,5, KCl 100mM, MnCl₂ 5mM, PMSF 0,1 mM, DTT 2mM, EDTA 1mM), y el rompimiento de las células bacterianas mediante el sonicador de vástago analógico Sonifier® S-250^a permitió obtener buen lisis de la bacteria E.coli, cepa JM109 y con posterior liberación de la enzima

arginasa, para verificar que hubiera actividad de la enzima se implementó el protocolo de (Archibald, 1957) .Obteniendo que para Arginasa I un valor de absorbancia 540nm de aproximadamente 0,7 y para Arginasa II de aproximadamente 0,4.

6.3 Verificación de la existencia de las Ambas isoformas de Arginasa mediante PCR

A continuación se presentan los resultados obtenidos en PCR, con ayuda del kit TAKARA SapphireAmp® Fast PCR Master Mix.

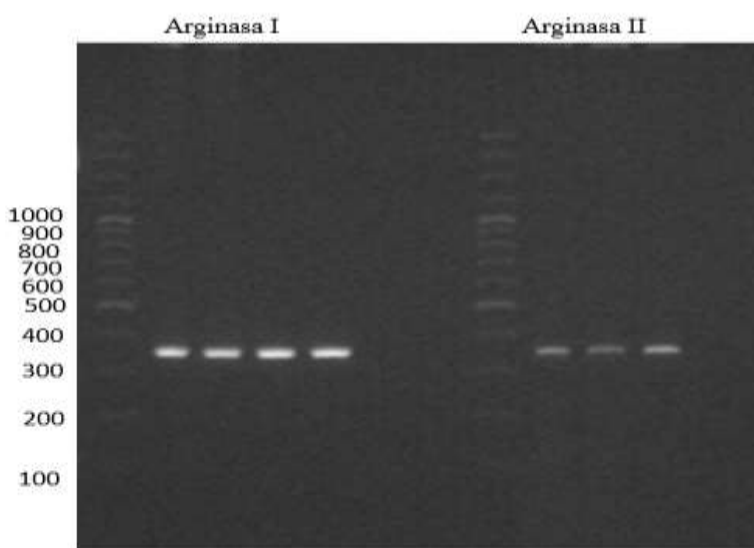


Ilustración 13. Verificación de ambas formas de Arginasa mediante PCR TAKARA. Visualizándose el DNA de ambas formas de arginasa (derecha arginasa I con un amplicon de 356, y para Arginasa II izquierda de 354) en un gel de Agarosa al 1.5%

6.4 Purificación de las isoformas de Arginasa mediante cromatografía de intercambio iónico (DEAE Cellulose)

6.4.1 Para La enzima Arginasa II

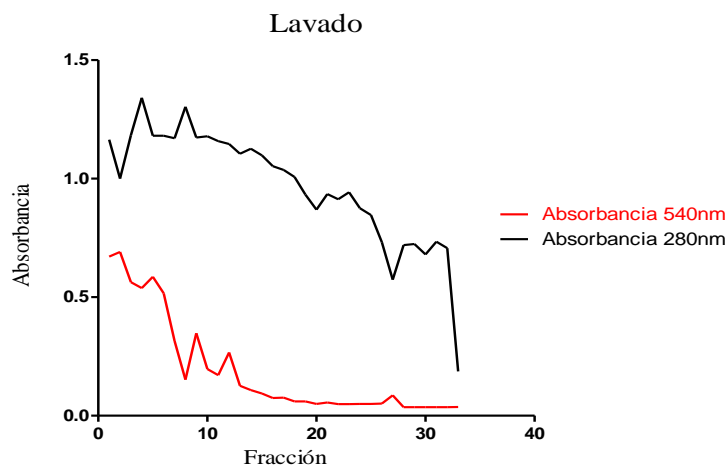


Ilustración 14. Lavado para Cromatografía de intercambio iónico DEAE cellulose para Arginasa II. Se obtuvieron 33 fracciones de 5ml cada una, en negro se observa la O.D 280 par proteína y en rojo un O.D de 540nm para actividad Arginasa.

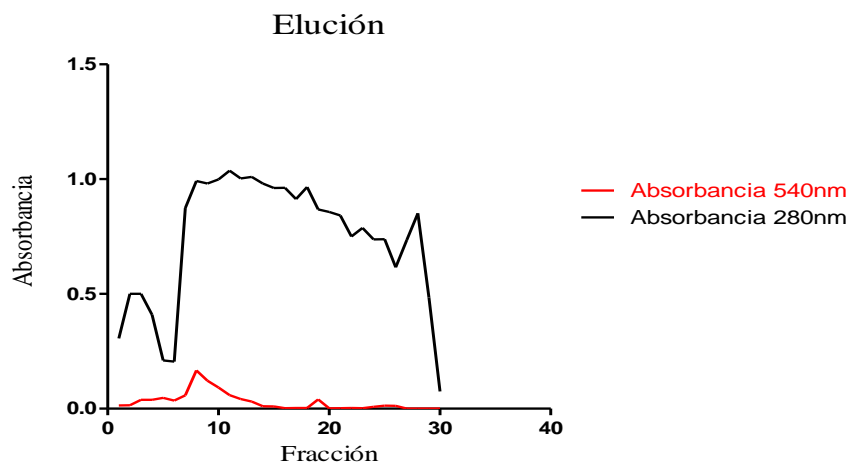


Ilustración 15. Elución para Cromatografía de intercambio iónico DEAE cellulose para Arginasa II, se obtuvieron 30 fracciones de 5ml cada una, en negro se observa la O.D 280 par proteína y en rojo un O.D de 540nm para actividad Arginasa.

6.4.2 Para la enzima Arginasa I

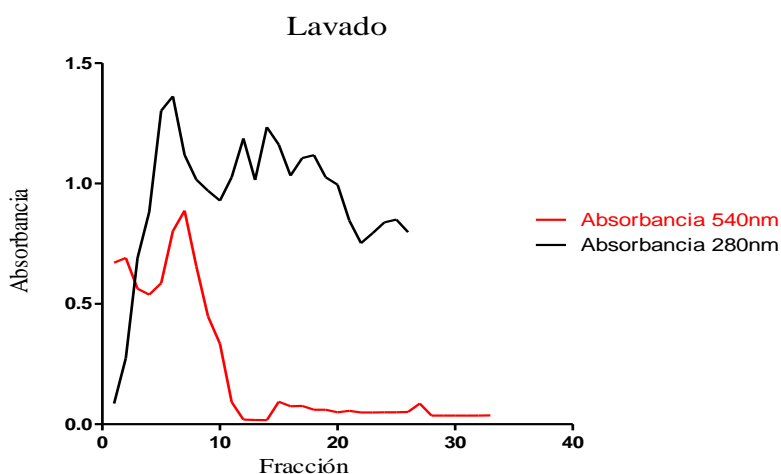


Ilustración 16. Lavado para Cromatografía de intercambio iónico DEAE cellulose para Arginasa II, se obtuvieron 33 fracciones de 5ml cada una, en negro se observa la O.D 280 par proteína y en rojo un O.D de 540nm para actividad Arginasa. Cabe resaltar que no se realizó el procedimiento de elución por que la enzima pasó de largo en el lavado.

Como podemos observar y es claro, la resina DEAE cellulose no retuvo ambas enzimas a enzima a pH 7.5, esto podría deberse a que en el lisado hay lípidos, fosfolípidos y demás proteínas que a ese pH estén cargadas negativamente, lo cual podría conllevar a que estas interactuaran con la DEAE cellulose, y la arginasa pasara de largo. De igual manera un estudio por (Kaysen & Strecker, 1973) acerca de la Purificación y propiedades de la arginasa de riñón de rata, muestran que a este pH la arginasa de Hígado no es absorbible por esta resina, pero se retiene en CM-cellulose, igualmente, la arginasa de riñón en las mismas condiciones no puede ser retenida ni por DEAE cellulose, ni por CM-cellulose. Esto puede ser explicado ya que es posible que se genere fallas nivel de la afinidad a la resina. Por tal razón es necesario hacer uso de pull dawn o de una resina con alta afinidad, ya sea de níquel (Tsui et al., 2009).

Por otra parte también es importante mencionar que la DEAE celulose puede ser un paso previo para purificación y luego someter las fracciones eluidas en una columna de CM-celulosa, tal como es realizado por (Carvajal et al., 2004)

6.5 Medición de actividad Arginasa. Y ensayos cinéticos (curva de progreso, saturación, dosis respuesta para ADMA y Hcy)

6.5.1 Ensayos para Arginasa II, Curva de progreso

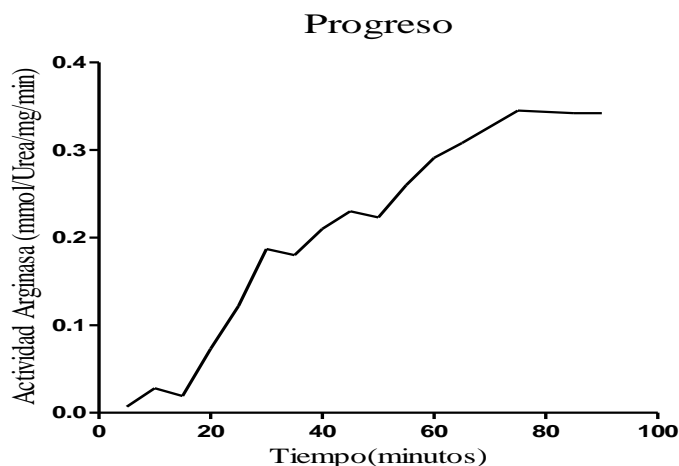


Ilustración 17. Curva de progreso para Arginasa II, en la cual expresamos la velocidad de reacción de la enzima Arginasa con respecto a su sustrato L-arginina y el producto obtenido (urea) con respecto al tiempo. En esta grafica observamos una fase lineal hasta aproximadamente 60 minutos, ya que aún hay sustrato disponible para la enzima encontrándose en una velocidad inicial, y es a partir de los 80 minutos donde la enzima a alcanzado toda su velocidad máxima y la L-arginina ya se ha unido por completo al sitio activo de la Arginasa II. Asimismo, hicimos uso de esta curva para determinar el tiempo (30 minutos) en el cual la enzima no se encuentra saturada para así probar nuestros componentes ADMA y Hcy

6.5.1 Ensayos para Arginasa II, Curva de saturación

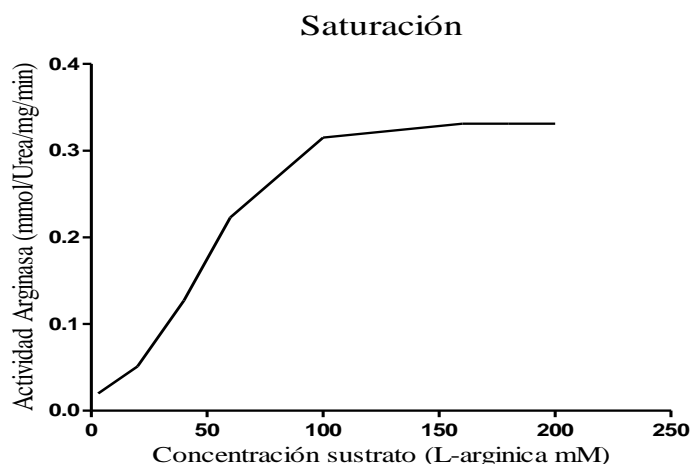


Ilustración 18. Curva de saturación para Arginasa II, en esta curva se fue variando las concentraciones de L-arginina (2.5mM a 250mM), manteniendo la concentración de la Arginasa constante, como podemos ver la velocidad va aumentando hasta llegar a una zona de saturación, aproximadamente en 100mM, es en este punto donde toda la enzima se encuentra como complejo enzima-sustrato. Esta curva se realizó con un tiempo enzima de 30 minutos, según la curva de progreso. La curva de saturación se hizo con el fin de determinar cuál es la concentración de L-arginina adecuada en la cual la enzima no ha alcanzado una velocidad máxima, para así probar nuestros componentes ADMA y Hcy, la concentración adecuada es de 50mM.

6.5.2 ADMA en Arginasa II

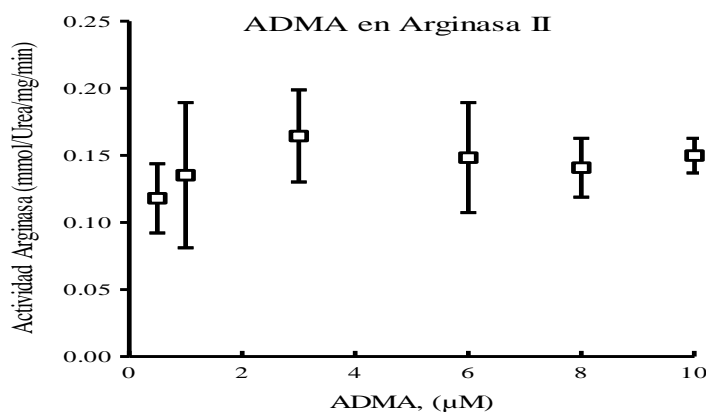


Ilustración 19. Ensayo de dosis respuesta para ADMA en arginasa II, aún tiempo de incubación 30min y a una concentración de L-arginina de 50mM, se hicieron uso de concentraciones para ADMA de 0,1 µM a 10 µM, ya que en condiciones basales los

valores de esta molécula se encuentran en ese rango (Nanayakkara et al., 2005). Con una desviación estándar de 0,03113, podemos decir que ADMA no genera ningún efecto regulador sobre la actividad arginasa II

6.5.3 Homocisteína en Arginasa II

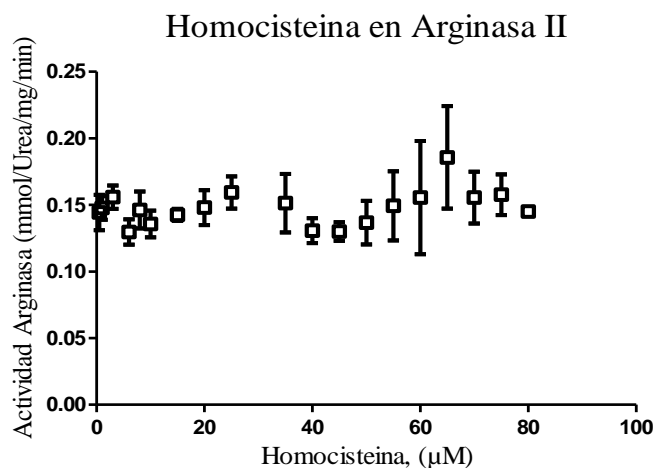


Ilustración 20. Ensayo de dosis respuesta para Hcy en arginasa II, aún tiempo de incubación 30min y a una concentración de L-arginina de 50mM, se hicieron uso de concentraciones para Hcy de 0,1 µM a 80 µM, y que por encima de 16 µmol/L se considera niveles normales en el plasma (Ganguly & Alam, 2015). Con una desviación estándar de 0,01317, podemos decir que Hcy no genera ningún efecto regulador sobre la actividad arginasa II

6.6 Ensayos para Arginasa I

6.5.1 Curva de progreso

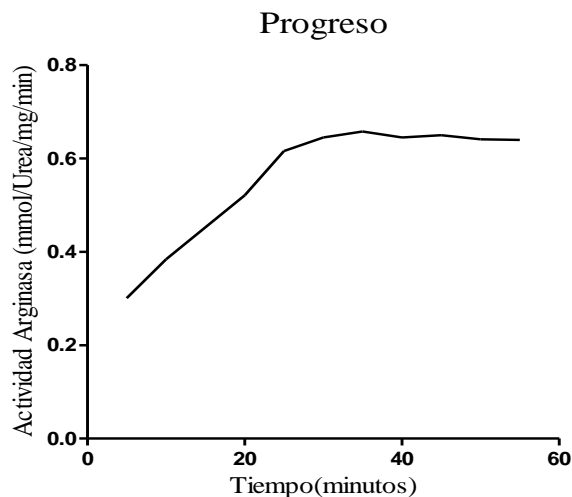


Ilustración 21. Curva de progreso para Arginasa I, en la cual expresamos la velocidad de reacción de la enzima Arginasa con respecto a su sustrato L-arginina y el producto obtenido (urea) con respecto al tiempo. En esta grafica observamos una fase lineal hasta aproximadamente 25 minutos, ya que aún hay sustrato disponible para la enzima encontrándose en una velocidad inicial, y es a partir de los 30 minutos donde la enzima a alcanzado toda su velocidad máxima y la L-arginina ya se ha unido por completo al sitio activo de la Arginasa I. Asimismo, hicimos uso de esta curva para determinar el tiempo (10 minutos) en el cual la enzima no se encuentra saturada para así probar nuestros componentes ADMA y Hcy

6.6.2 Ensayos para Arginasa I, Curva de Saturación

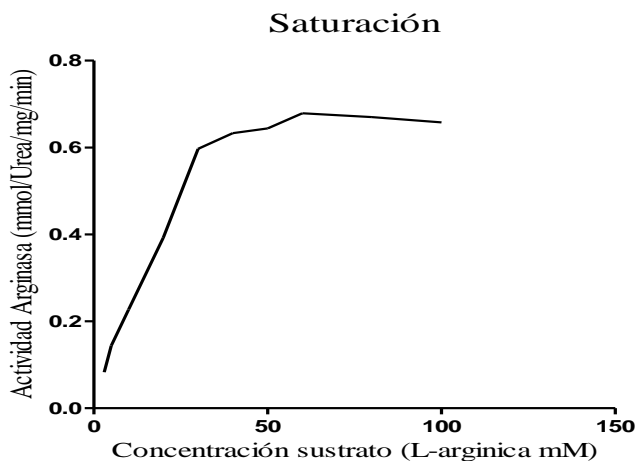


Ilustración 22. Curva de saturación para Arginasa I. en esta curva se fue variando las concentraciones de L-arginina (2.5mM a 100mM), manteniendo la concentración de la Arginasa constante, como podemos ver la velocidad va aumentando hasta llegar a una zona de saturación, aproximadamente en 40mM, es en este punto donde toda la enzima se encuentra como complejo enzima-sustrato. Esta curva se realizó con un tiempo de incubación de 10 minutos, según la curva de progreso. La curva de saturación se hizo con el fin de determinar cuál es la concentración de L-arginina adecuada en la cual la enzima no ha alcanzado una velocidad máxima, para así probar nuestros componentes ADMA y Hcy, la concentración adecuada es de 11mM.

6.6.3 ADMA en Arginasa I

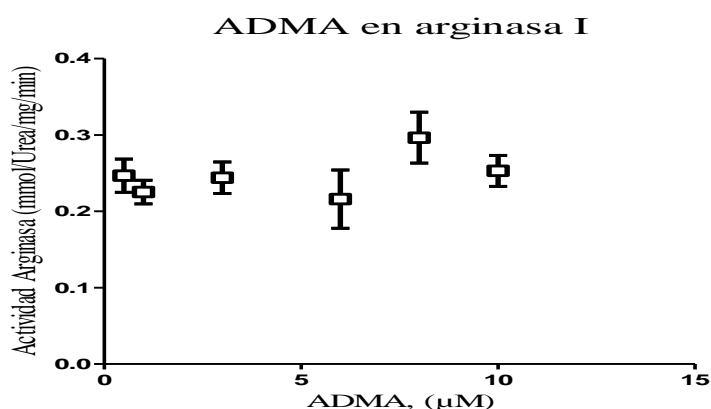


Ilustración 23. Ensayo de dosis respuesta para ADMA en arginasa I. aún tiempo de incubación 10min y a una concentración de L-arginina de 11mM, se hicieron uso de concentraciones para ADMA de 0,1 µM a 10 µM, ya que en condiciones basales los valores de esta molécula se encuentran en ese rango (Nanayakkara et al., 2005). Con una desviación estándar de 0,02803, podemos decir que ADMA no genera ningún efecto regulador sobre la actividad arginasa I.

6.6.4 Homocisteína en Arginasa I

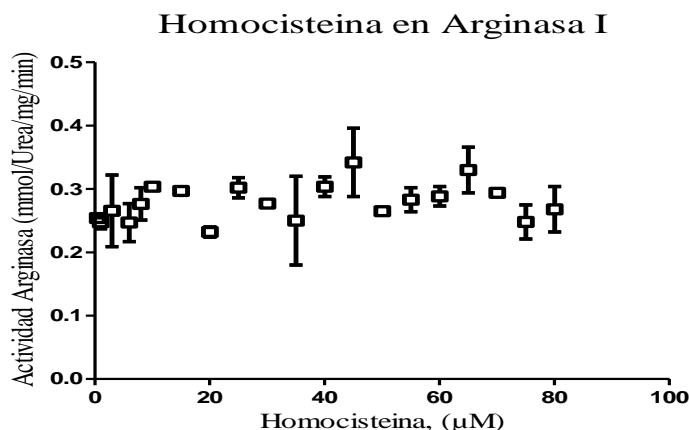


Ilustración 24. Ensayo de dosis respuesta para Hcy en arginasa I, aún tiempo de incubación 10min y a una concentración de L-arginina de 11mM, se hicieron uso de concentraciones para Hcy de 0,1 µM a 80 µM, y que por encima de 16 µmol/L se considera niveles normales en el plasma (Ganguly & Alam, 2015). Con una desviación estándar de 0,06214, podemos decir que Hcy no genera ningún efecto regulador sobre la actividad arginasa II

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Hoy en día se conoce que el papel fisiológico de Dimetilarginina simétrica (ADMA) y Homocisteína (Hcy) puede desempeñar un papel prominente en la patogenia, progresión de enfermedades cardiovasculares y arterosclerosis (Ganguly & Alam, 2015). Por un lado, recientemente se ha postulado que ADMA se encuentran en las células endoteliales humanas y posterior a esto, estudios recientes muestran que aumentos de esta molécula en el plasma están estrechamente asociados a hipertrigliceridemia, hiperglucemia, hipertensión, e hiperhomocisteinemia (Markus C Stühlinger et al., 2003) (M C Stühlinger et al., 2001) (Ito et al., 1999). En este orden de ideas, la Homocisteína o hiperhomocisteinemia presenta una correlación significativa con ataques cardiacos, accidentes cerebro-vasculares, conduciendo a reducción de la flexibilidad de los vasos, y altera el proceso de la hemostasia (Faraci, 2003). Asimismo, Niveles elevados de Homocisteína se encuentran asociados con un mayor riesgo de enfermedad arterial coronaria en pacientes con insuficiencia renal crónica (Jakovljevic et al., 2015).

En concordancia con esto, Ambas moléculas han sido fuertemente relacionados con la biodisponibilidad del óxido nítrico o NO. Por un lado, ADMA es un inhibidor competitivo endógeno de eNOS, puede promover el desacoplamiento de esta enzima, lo que lleva a un aumento de la producción de superóxido y otras especies reactivas de oxígeno, que, a su vez, puede provocar una nueva disminución de la disponibilidad del NO (B. Chen et al., 2014). Asimismo, Varias líneas sugieren que el aumento del estrés oxidativo y los niveles de especies reactivas de oxígeno juegan un papel clave en los cambios vasculares con relación a la función del endotelio, provocando hiperhomocisteinemia (HHcy) (Eberhardt et al., 2000). HHcy puede aumentar el estrés oxidativo mediante la inhibición de la expresión o función de las enzimas antioxidantes clave, tales como la superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD) (X. Zhang et al., 2000). Es de gran importancia mencionar que la bioactividad de NO depende, en parte, de su interacción con las especies reactivas del oxígeno, en particular superóxido. Muchos estudios han sugerido que la bioactividad de NO derivado del endotelio se encuentra disminuido cuando se encuentra bajo esta molécula (HHcy) (Ungvari et al., 2002) (Dayal et al., 2004) (Lentz et al., 2000)

Teniendo en cuenta que, tanto ADMA, como Hcy, están fuertemente relacionados y desempeñan un papel primordial en la patogénesis e enfermedades de origen cardiovascular y que estas moléculas están sujetas a numerosos cambios a nivel fisiológico. EL objetivo de este trabajo fue analizar la función cumple ADMA y Hcy en relación a una conjunto de enzimas llamadas las Arginasa, en sus dos isoformas (I y II). Debido a que recientemente esta familia de enzimas ha emergido como un importante regulador crítico en la vía de señalización que comprende la síntesis de NO, y a su vez en la disfunción vascular.

Como se pudo observar en los experimentos realizados ADMA y Hcy no generan ningún efecto sobre la actividad, de las Arginasa I y II en nuestro modelo de proteína recombinante, (plásmido pBluescript KS (+) en la cepa de E. coli JM109). Aun así, en concordancia con nuestro estudio, una investigación realizada por (B. Chen et al., 2014) en donde hacían uso de BPAC (ovine pulmonary arterial endothelial cells) querían determinar si ADMA podría estar involucrada en el metabolismo de la arginasa al actuar como sustrato o como inhibidor competitivo de esta enzima. Mediante la cinética de Michaelis-Menten y con concentraciones de ADMA de 0,1- 30mM obtuvieron como resultado que ADMA no es un compuesto que pueda generar una reacción para obtener urea y no hubo ningún efecto medible sobre la actividad arginasa. Sin embargo y de gran importancia, según este estudio a concentraciones de 100 μ M ADMA presento un impacto significativo

sobre el número de células viables en BPAC en un 30% mayor en comparación con células control, es decir, ADMA al inducir al crecimiento celular podría aumentar la proliferación celular vascular, mediante la producción de L-ornitina, el cual es el primer paso para la síntesis de poliaminas y prolina, lo cual podría estar relacionado con la enzima arginasa, y a su vez con alteraciones vasculares a nivel pulmonar.

Es de gran importancia mencionar que ADMA se encuentra en mayor abundancia en los pulmones (Bulau et al., 2007) y que esta molécula cuando se encuentra sometida a condiciones patológicas que alternan su funcionalidad presenta cambios en la actividad arginasa. Por ejemplo, un estudio realizado por (Sousse et al., 2011), mediante un modelo animal(ovino) sometido a inhalación de humo, encontraron que después de tres semanas, las concentraciones de arginasa y ADMA en el homogenizado de pulmón incrementaron significativamente en los animales lesionados. El incremento ADMA podría ser el resultado en la reducción de su principal hidrolasa, DDAH-2(4661 ± 995 en el grupo no lesionada frente a 242 ± 97 en el grupo lesionado). Sugiriendo de esta manera que los niveles aumentados de ADMA pueden contribuir a una anomalía en la fisiología en las vías respiratorias. En este contexto, los investigadores proponen un nuevo mecanismo asociado a una lesión aguda de pulmón y deposición de colágeno, en el cual DDAH-2 se inactiva por la oxidación, lo que resulta en una mayor acumulación de ADMA y una disminución en la actividad de NOS. Como consecuencia, L-arginina tiene una mayor disponibilidad para el metabolismo de la arginasa, lo que resulta a su vez en un incremento de la expresión de ODC y OAT, la generación de hidroxiprolina, asociado a un crecimiento de la deposición de colágeno en el pulmón.

Igualmente, ha sido propuesto que la hipoxia se encuentra relacionado con un incremento no solo de la molécula ADMA, sino que también de Hcy y a su vez con alteraciones el sistema cardiovascular. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, tenían como objetivo determinar el efecto de ADMA y Hcy sobre arginasa y su posible rol en el desarrollo de hipertensión inducida por hipoxia, para tal estudio se hizo uso de ratas wistar, las cuales se sometieron a hipoxia hipobárica intermitente en una cámara hiperbarca a 428 torr (4600m), después de un tiempo los animales fueron sacrificados y separados en dos grupos, ratas intolerantes (aquellas que se hipertensaban e iban perdiendo peso) y ratas tolerantes o control, posterior a eso se midió actividad arginasa y con concentración de ADMA y Hcy de $0,1 \mu\text{M}$ a $10 \mu\text{M}$, mediante el método calorimétrico haciendo uso del reactivo a-isonitrosopropiofenona. Se obtuvo como resultado que la hipoxia genera una

activación sobre ADMA Y Hcy, lo que conlleva a un aumento en la actividad Arginasa, la reducción de la biodisponibilidad de L-arginina y por ende una disminución en de NO plasmático (Taborda, 2015)

En conclusión, cuando la enzima arginasa se encuentra sometida a cualquier cambio con respecto a las patologías de origen cardiovascular, tanto la molécula ADMA y Hcy pueden generar una regulación alosterica. Sin, embargo cuando esta enzima no está sujeta ni a hipoxia, ni a hipertensión, ni a ninguna alteración que contribuya a una inhibición o activación de la misma, el efecto va hacer nulo, como en el caso de nuestro modelo de proteína recombinante, el cual serviría como un control. Por otra parte, es de gran importancia resaltar que la enzima arginasa no se encuentra purificada, y esta podría estar sometida a otras moléculas inhibidoras que podrían estar alterando los ensayos cinéticos de ADMA y Hcy y por tal razón no se puede conocer a exactitud cuáles son los efectos sobre las isoformas. Además cabe resaltar que en este modelo de estudio se hizo uso de proteína recombinante, la cual puede sufrir modificaciones y mutaciones que podrían estar alterando el ensayo.

8. REFERENCIAS

- Archibald R.M. (1957). Colorimetric measurement of uric acid. *Clin. Chem.* 3:102–105
- Bachetti, T., Comini, L., Francolini, G., Bastianon, D., Valetti, B., Cadei, M., ... Ferrari, R. (2004). Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37(2), 515–23. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.05.004>
- Badimón, L., & Martínez-González, J. (2002). Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Revista Española de Cardiología*, 55(Supl.1), 17–26. Retrieved from <http://www.revespcardiol.org/es/endotelio-proteccion-vascular-nuevos-conocimientos/articulo/13035740/>
- Badimón, L., & Martínez-González, J. (2006). Disfunción endotelial. *Revista Española de Cardiología*, 6(Supl.A), 21–30. <http://doi.org/10.1157/13087918>
- Bagnost, T., Berthelot, A., Bouhaddi, M., Laurant, P., André, C., Guillaume, Y., & Demougeot, C. (2008). Treatment with the arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine improves vascular function and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension*, 26(6), 1110–8. <http://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282fcc357>
- Baranyi, A., Amouzadeh-Ghadikolai, O., Rothenhäusler, H.-B., Theokas, S., Robier, C.,

- Baranyi, M., ... Meinitzer, A. (2015). Nitric Oxide-Related Biological Pathways in Patients with Major Depression. *PLoS One*, 10(11), e0143397. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0143397>
- Baumgartner-Parzer, S. M., & Waldhäusl, W. K. (2001). The endothelium as a metabolic and endocrine organ: its relation with insulin resistance. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 109(Suppl 2), S166–S179. <http://doi.org/10.1055/s-2001-18579>
- Beleznai, T., Feher, A., Spielvogel, D., Lansman, S. L., & Bagi, Z. (2011). Arginase 1 contributes to diminished coronary arteriolar dilation in patients with diabetes. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 300(3), H777–83. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00831.2010>
- Benavides Trujillo, M. C., & Pinzón Tovar, A. (n.d.). Oxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. *Revista Colombiana de Anestesiología*, 36(1), 45–52. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-33472008000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Berkowitz, D. E. (2003). Arginase Reciprocally Regulates Nitric Oxide Synthase Activity and Contributes to Endothelial Dysfunction in Aging Blood Vessels. *Circulation*, 108(16), 2000–2006. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000092948.04444.C7>
- Böger, R. H., Lentz, S. R., Bode-Böger, S. M., Knapp, H. R., & Haynes, W. G. (2001). Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 100(2), 161–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171285>
- Bulau, P., Zakrzewicz, D., Kitowska, K., Leiper, J., Gunther, A., Grimminger, F., & Eickelberg, O. (2007). Analysis of methylarginine metabolism in the cardiovascular system identifies the lung as a major source of ADMA. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 292(1), L18–24. <http://doi.org/10.1152/ajplung.00076.2006>
- Cannon, R. O. (1998). Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry*, 44(8 Pt 2), 1809–19. Retrieved from <http://www.clinchem.org/content/44/8/1809.abstract>
- Carvajal, N., Orellana, M. S., Bórquez, J., Uribe, E., López, V., & Salas, M. (2004). Non-chelating inhibition of the H101N variant of human liver arginase by EDTA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(8), 1465–9. <http://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.05.005>
- Cederbaum, S. D., Yu, H., Grody, W. W., Kern, R. M., Yoo, P., & Iyer, R. K. (2004). Arginases I and II: do their functions overlap? *Molecular Genetics and Metabolism*, 81 Suppl 1, S38–44. <http://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.10.012>
- Chaava, M. M., Bukiiia, T. S., & Shaburishvili, T. S. (2005). [Homocysteine as risk marker

- of cardiovascular disease]. *Georgian Medical News*, (127), 65–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16308448>
- Chen, B., Strauch, K., Jin, Y., Cui, H., Nelin, L. D., & Chicoine, L. G. (2014). Asymmetric dimethylarginine does not inhibit arginase activity and is pro-proliferative in pulmonary endothelial cells. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 41(7), 469–74. <http://doi.org/10.1111/1440-1681.12252>
- Chen, P., Tsai, A., Berka, V., & Wu, K. K. (1996). Evidence for Bidomain Structure and Successful Reconstitution of Catalytic Activity. *Biochemistry*, 271(24), 14631–14635.
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., ... Stern, D. M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91(10), 3527–61. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/91/10/3527.abstract>
- Dayal, S., Arning, E., Bottiglieri, T., Böger, R. H., Sigmund, C. D., Faraci, F. M., & Lentz, S. R. (2004). Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 35(8), 1957–62. <http://doi.org/10.1161/01.STR.0000131749.81508.18>
- Dunn, J., Gutbrod, S., Webb, A., Pak, A., Jandu, S. K., Bhunia, A., ... Santhanam, L. (2011). S-nitrosation of arginase 1 requires direct interaction with inducible nitric oxide synthase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 355(1-2), 83–9. <http://doi.org/10.1007/s11010-011-0841-2>
- Durante, W. (2013). Role of arginase in vessel wall remodeling. *Frontiers in Immunology*, 4, 111. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00111>
- Eberhardt, R. T., Forgione, M. A., Cap, A., Leopold, J. A., Rudd, M. A., Trolliet, M., ... Loscalzo, J. (2000). Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(4), 483–91. <http://doi.org/10.1172/JCI8342>
- Elms, S., Chen, F., Wang, Y., Qian, J., Askari, B., Yu, Y., ... Fulton, D. J. R. (2013). Insights into the arginine paradox: evidence against the importance of subcellular location of arginase and eNOS. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 305(5), H651–66. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00755.2012>
- Faraci, F. M. (2003). Hyperhomocysteinemia: a million ways to lose control. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(3), 371–3. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000063607.56590.7F>
- Forstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., & Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23(6_Pt_2), 1121–1131. <http://doi.org/10.1161/01.HYP.23.6.1121>
- Förstermann, U., & Münzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113(13), 1708–14.

- <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532>
- Fowler, B. (2005). Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Seminars in Vascular Medicine*, 5(2), 77–86.
<http://doi.org/10.1055/s-2005-872394>
- Ganguly, P., & Alam, S. F. (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition Journal*, 14, 6. <http://doi.org/10.1186/1475-2891-14-6>
- Ganz, P. (2005). Erectile dysfunction: pathophysiologic mechanisms pointing to underlying cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*, 96(12B), 8M–12M.
<http://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.07.004>
- Gao, X., Xu, X., Belmadani, S., Park, Y., Tang, Z., Feldman, A. M., ... Zhang, C. (2007). TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(6), 1269–75. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.142521>
- Gotoh, T., Sonoki, T., Nagasaki, A., Terada, K., Takiguchi, M., & Mori, M. (1996). Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Letters*, 395(2-3), 119–122. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)01015-0](http://doi.org/10.1016/0014-5793(96)01015-0)
- Hermann, M., Flammer, A., & Lüscher, T. F. (2006). Nitric oxide in hypertension. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)*, 8(12 Suppl 4), 17–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170603>
- Hofmann, M. A., Lalla, E., Lu, Y., Gleason, M. R., Wolf, B. M., Tanji, N., ... Schmidt, A. M. (2001). Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(6), 675–83. <http://doi.org/10.1172/JCI10588>
- Huynh, N. N., Andrews, K. L., Head, G. A., Khong, S. M. L., Mayorov, D. N., Murphy, A. J., ... Chin-Dusting, J. P. F. (2009). Arginase II knockout mouse displays a hypertensive phenotype despite a decreased vasoconstrictory profile. *Hypertension*, 54(2), 294–301. <http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.121731>
- Hwang, H. M., Lee, J. H., Min, B. S., Jeon, B. H., Hoe, K. L., Kim, Y. M., & Ryoo, S. (2015). A Novel Arginase Inhibitor Derived from *Scutellaria indica* Restored Endothelial Function in ApoE-Null Mice Fed a High-Cholesterol Diet. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 355(1), 57–65.
<http://doi.org/10.1124/jpet.115.224592>
- Ikeda, U., Ikeda, M., Minota, S., & Shimada, K. (1999). Homocysteine Increases Nitric Oxide Synthesis in Cytokine-Stimulated Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation*, 99(9), 1230–1235. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.99.9.1230>
- Iribarra P, V., Germain A, A., Cuevas M, A., Faúndez G, L., & Valdés S, G. (2000).

- Disfunción endotelial como alteración primaria en las patologías vasculares. *Revista Médica de Chile*, 128(6), 659–670. <http://doi.org/10.4067/S0034-98872000000600014>
- Ito, A., Tsao, P. S., Adimoolam, S., Kimoto, M., Ogawa, T., & Cooke, J. P. (1999). Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*, 99(24), 3092–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377069>
- Iyamu, E. W., Ekekezie, C., & Woods, G. M. (2007). In vitro evidence of the inhibitory capacity of chloroquine on arginase activity in sickle erythrocytes. *British Journal of Haematology*, 139(2), 337–43. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06798.x>
- Jakovljevic, B., Gasic, B., Kovacevic, P., Rajkovaca, Z., & Kovacevic, T. (2015). Homocystein as a risk factor for developing complications in chronic renal failure. *Materia Socio-Medica*, 27(2), 95–8. <http://doi.org/10.5455/msm.2015.27.95-98>
- Jeunemaitre, X., Soubrier, F., Kotelevtsev, Y. V., Lifton, R. P., Williams, C. S., Charru, A., ... Corvol, P. (1992). Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. *Cell*, 71(1), 169–180. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90275-H](http://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90275-H)
- Johnson, F. K., Peyton, K. J., Liu, X.-M., Azam, M. A., Shebib, A. R., Johnson, R. A., & Durante, W. (2015). Arginase promotes endothelial dysfunction and hypertension in obese rats. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 23(2), 383–90. <http://doi.org/10.1002/oby.20969>
- Kao, C. C., Wedes, S. H., Hsu, J. W., Bohren, K. M., Comhair, S. A. A., Jahoor, F., & Erzurum, S. C. (2015). Arginine metabolic endotypes in pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation*, 5(1), 124–34. <http://doi.org/10.1086/679720>
- Kaysen, G. a, & Strecker, H. J. (1973). Purification and properties of arginase of rat kidney. *The Biochemical Journal*, 133(4), 779–788.
- Kim, J. H., Bugaj, L. J., Oh, Y. J., Bivalacqua, T. J., Ryoo, S., Soucy, K. G., ... Berkowitz, D. E. (2009). Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 107(4), 1249–57. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.91393.2008>
- Kobuchi, S., Miura, K., Iwao, H., & Ayajiki, K. (2015). Nitric oxide modulation of endothelium-derived hyperpolarizing factor in agonist-induced depressor responses in anesthetized rats. *European Journal of Pharmacology*. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.053>
- Kovamees, O., Shemyakin, A., Eriksson, M., Angelin, B., & Pernow, J. (2015). Arginase inhibition improves endothelial function in patients with familial hypercholesterolaemia irrespective of their cholesterol levels. *Journal of Internal Medicine*. <http://doi.org/10.1111/joim.12461>
- Lentz, S. R., Erger, R. A., Dayal, S., Maeda, N., Malinow, M. R., Heistad, D. D., & Faraci, F. M. (2000). Folate dependence of hyperhomocysteinemia and vascular dysfunction

- in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 279(3), H970–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10993757>
- Liu, T., Lin, J., Ju, T., Chu, L., & Zhang, L. (2015). Vascular smooth muscle cell differentiation to an osteogenic phenotype involves matrix metalloproteinase-2 modulation by homocysteine. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <http://doi.org/10.1007/s11010-015-2432-0>
- López, V., Alarcón, R., Orellana, M. S., Enríquez, P., Uribe, E., Martínez, J., & Carvajal, N. (2005). Insights into the interaction of human arginase II with substrate and manganese ions by site-directed mutagenesis and kinetic studies. Alteration of substrate specificity by replacement of Asn149 with Asp. *The FEBS Journal*, 272(17), 4540–8. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04874.x>
- Lopez, V., Siques, P., Brito, J., Vallejos, C., Naveas, N., Carvallo, C., ... Carvajal, N. (2009). Upregulation of arginase expression and activity in hypertensive rats exposed to chronic intermittent hypobaric hypoxia. *High Altitude Medicine & Biology*, 10(4), 373–81. <http://doi.org/10.1089/ham.2008.1072>
- Massion, P. B., Feron, O., Dessy, C., & Balligand, J.-L. (2003). Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circulation Research*, 93(5), 388–98. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000088351.58510.21>
- McDonald, K. K., Zharikov, S., Block, E. R., & Kilberg, M. S. (1997). A Caveolar Complex between the Cationic Amino Acid Transporter 1 and Endothelial Nitric-oxide Synthase May Explain the “Arginine Paradox.” *Journal of Biological Chemistry*, 272(50), 31213–31216. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31213>
- Millatt, L. J., Whitley, G. S., Li, D., Leiper, J. M., Siragy, H. M., Carey, R. M., & Johns, R. A. (2003). Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 108(12), 1493–8. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000089087.25930.FF>
- Ming, X.-F., Barandier, C., Viswambharan, H., Kwak, B. R., Mach, F., Mazzolai, L., ... Yang, Z. (2004). Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation*, 110(24), 3708–14. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000142867.26182.32>
- Morris, C. R., Kato, G. J., Poljakovic, M., Wang, X., Blackwelder, W. C., Sachdev, V., ... Gladwin, M. T. (2005). Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*, 294(1), 81–90. <http://doi.org/10.1001/jama.294.1.81>
- Morris, S. M. (2009). Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *British Journal of Pharmacology*, 157(6), 922–30. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00278.x>
- Nagai, A., Imamura, M., Watanabe, T., & Azuma, H. (2008). Involvement of altered

- arginase activity, arginase I expression and NO production in accelerated intimal hyperplasia following cigarette smoke extract. *Life Sciences*, 83(13-14), 453–459. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.07.016>
- Nanayakkara, P. W. B., Teerlink, T., Stehouwer, C. D. A., Allajar, D., Spijkerman, A., Schalkwijk, C., ... van Guldener, C. (2005). Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentration is independently associated with carotid intima-media thickness and plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) concentration in patients with mild-to-moderate renal failure. *Kidney International*, 68(5), 2230–6. <http://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00680.x>
- Nishida, C. R., & Ortiz de Montellano, P. R. (1999). Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(21), 14692–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329664>
- Nuño-Ayala, M., Carnicer, R., Guzmán, M. A., Guillén, N., Navarro, M. Á., Arnal, C., & Osada, J. (2010). Hiperhomocisteinemia. Panorama actual y contribución del ratón a su estudio. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 22(5), 200–219. <http://doi.org/10.1016/j.arteri.2010.04.008>
- O'Driscoll, J. G., Green, D. J., Rankin, J. M., & Taylor, R. R. (1999). Nitric oxide-dependent endothelial function is unaffected by allopurinol in hypercholesterolaemic subjects. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 26(10), 779–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10549401>
- Orozco, B. R. (2015). ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR (ECV) EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA (ERC). *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(2), 142–155. <http://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.04.003>
- Pernow, J., & Jung, C. (2016). The Emerging Role of Arginase in Endothelial Dysfunction in Diabetes. *Current Vascular Pharmacology*, 14(2), 155–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26638796>
- Peters, D., Berger, J., Langnaese, K., Derst, C., Madai, V. I., Krauss, M., ... Laube, G. (2013). Arginase and Arginine Decarboxylase - Where Do the Putative Gate Keepers of Polyamine Synthesis Reside in Rat Brain? *PloS One*, 8(6), e66735. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0066735>
- Petrova, J. J., Manolov, V. E., Vasilev, V. G., Zlatareva, D. K., & Tzatchev, K. N. (2015). ADMA--a Possible Marker for Early Therapeutic Outcome in Acute Stroke. *Clinical Laboratory*, 61(11), 1653–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26731989>
- Pullamsetti, S., Kiss, L., Ghofrani, H. A., Voswinkel, R., Haredza, P., Klepetko, W., ... Schermuly, R. T. (2005). Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(9),

- 1175–7. <http://doi.org/10.1096/fj.04-3223fje>
- Romero, M. J., Platt, D. H., Tawfik, H. E., Labazi, M., El-Remessy, A. B., Bartoli, M., ... Caldwell, R. W. (2008). Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circulation Research*, *102*(1), 95–102. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.155028>
- Ryoo, S., Bhunia, A., Chang, F., Shoukas, A., Berkowitz, D. E., & Romer, L. H. (2011). OxLDL-dependent activation of arginase II is dependent on the LOX-1 receptor and downstream RhoA signaling. *Atherosclerosis*, *214*(2), 279–87. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.10.044>
- Sahni, S., Palkar, A. V., Rochelson, B. L., Kępa, W., & Talwar, A. (2015). Pregnancy and pulmonary arterial hypertension: A clinical conundrum. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. <http://doi.org/10.1016/j.preghy.2015.01.004>
- Schnorr, O., Brossette, T., Momma, T. Y., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Schroeter, H., & Sies, H. (2008). Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *476*(2), 211–5. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.040>
- Scott, J. A., Duong, M., Young, A. W., Subbarao, P., Gauvreau, G. M., & Grasmann, H. (2014). Asymmetric dimethylarginine in chronic obstructive pulmonary disease (ADMA in COPD). *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(4), 6062–71. <http://doi.org/10.3390/ijms15046062>
- Shemyakin, A., Kövamees, O., Rafnsson, A., Böhm, F., Svenarud, P., Settergren, M., ... Pernow, J. (2012). Arginase inhibition improves endothelial function in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, *126*(25), 2943–50. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.140335>
- Sibal, L., Agarwal, S. C., Home, P. D., & Boger, R. H. (2010). The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reviews*, *6*(2), 82–90. <http://doi.org/10.2174/157340310791162659>
- Sousse, L. E., Yamamoto, Y., Enkhbaatar, P., Rehberg, S. W., Wells, S. M., Leonard, S., ... Traber, D. L. (2011). Acute lung injury-induced collagen deposition is associated with elevated asymmetric dimethylarginine and arginase activity. *Shock (Augusta, Ga.)*, *35*(3), 282–8. <http://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181fddd82>
- Starkebaum, G., & Harlan, J. M. (1986). Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *Journal of Clinical Investigation*, *77*(4), 1370–1376. <http://doi.org/10.1172/JCII12442>
- Stühlinger, M. C., Oka, R. K., Graf, E. E., Schmölzer, I., Upson, B. M., Kapoor, O., ... Cooke, J. P. (2003). Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*, *108*(8), 933–8.

<http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000085067.55901.89>

- Stühlinger, M. C., Tsao, P. S., Her, J. H., Kimoto, M., Balint, R. F., & Cooke, J. P. (2001). Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*, *104*(21), 2569–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714652>
- Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., Núñez, L., Vaquero, M., & Delpón, E. (2006). Efectos del óxido nítrico sobre la función cardíaca. *Revista Española de Cardiología*, *6*(Supl.A), 3–20. <http://doi.org/10.1157/13087917>
- Thengchaisri, N., Hein, T. W., Wang, W., Xu, X., Li, Z., Fossum, T. W., & Kuo, L. (2006). Upregulation of arginase by H₂O₂ impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*(9), 2035–42. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000233334.24805.62>
- Topal, G., Topal, J.-L. G., Brunet, A., Walch, L., Boucher, J.-L., & David-Duflho, M. (2006). Mitochondrial arginase II modulates nitric-oxide synthesis through nonfreely exchangeable L-arginine pools in human endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *318*(3), 1368–74. <http://doi.org/10.1124/jpet.106.103747>
- Tousoulis, D., Kampoli, A.-M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N., & Stefanadis, C. (2012). The role of nitric oxide on endothelial function. *Current Vascular Pharmacology*, *10*(1), 4–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112350>
- Ungvari, Z., Csiszar, A., Bagi, Z., & Koller, A. (2002). Impaired nitric oxide-mediated flow-induced coronary dilation in hyperhomocysteinemia: morphological and functional evidence for increased peroxynitrite formation. *The American Journal of Pathology*, *161*(1), 145–53. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64166-1](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64166-1)
- Vallance, P. (2001). GENERAL CARDIOLOGY: Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*, *85*(3), 342–350. <http://doi.org/10.1136/heart.85.3.342>
- Vergnani, L., Hatric, S., Ricci, F., Passaro, A., Manzoli, N., Zuliani, G., ... Malinski, T. (2000). Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production : key role of L-arginine availability. *Circulation*, *101*(11), 1261–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725285>
- Villalba, N., Sackheim, A. M., Nunez, I. A., Hill-Eubanks, D. C., Nelson, M. T., Wellman, G. C., & Freeman, K. (2016). Traumatic Brain Injury Causes Endothelial Dysfunction in the Systemic Microcirculation through Arginase-1-Dependent Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Journal of Neurotrauma*. <http://doi.org/10.1089/neu.2015.4340>
- Vockley, J. G., Jenkinson, C. P., Shukla, H., Kern, R. M., Grody, W. W., & Cederbaum, S. D. (1996). Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics*, *38*(2), 118–23. <http://doi.org/10.1006/geno.1996.0606>
- Welch, G. N., Upchurch, G. R., Farivar, R. S., Pigazzi, A., Vu, K., Brecher, P., ...

- Loscalzo, J. Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of Nos2. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 110(1), 22–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9460080>
- Yang, L., Lewis, C. M., Chandrasekharan, U. M., Kinney, C. M., Dicorleto, P. E., & Kashyap, V. S. (2006). Arginase activity is increased by thrombin: a mechanism for endothelial dysfunction in arterial thrombosis. *Journal of the American College of Surgeons*, 203(6), 817–26. <http://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2006.08.023>
- Zakalskiy, A. E., Zakalska, O. M., Rzhpetskiy, Y. A., Potocka, N., Stasyk, O. V., Horak, D., & Gonchar, M. V. (2012). Overexpression of (His)6-tagged human arginase I in *Saccharomyces cerevisiae* and enzyme purification using metal affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, 81(1), 63–68. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2011.09.001>
- Zhang, C., Hein, T. W., Wang, W., Miller, M. W., Fossum, T. W., McDonald, M. M., ... Kuo, L. (2004). Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Hypertension*, 44(6), 935–43. <http://doi.org/10.1161/01.HYP.0000146907.82869.f2>
- Zhang, X., Li, H., Jin, H., Ebin, Z., Brodsky, S., & Goligorsky, M. S. (2000). Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 279(4), F671–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10997917>

