

**ESTUDIOS INMUNOLOGICOS SOBRE LA ARGINASA DE HIGADO Y DE ERITROCITOS HUMANOS. I. REACCIONES DE NEUTRALIZACION Y PRECIPITACION \***

Immunological Studies on Human Liver and Erythrocyte Arginase.  
I. Neutralization and Precipitation.

JULIO CABELLO, VICTORIA PRAJOUX y MARÍA PLAZA

*Instituto de Química Fisiológica y Patológica, Escuela de Medicina, Universidad de Chile, Borgoño 1470, Santiago, Chile.*

Recibido para su publicación el 11 de Junio de 1963.

**RESUMEN**

La inyección de preparaciones purificadas de arginasa, extraída del hígado o de los eritrocitos humanos, provocó en el conejo la formación de anticuerpos que precipitan la enzima contenida en las soluciones de ambos antígenos. La actividad de la enzima no experimentó una reducción importante como consecuencia de su combinación con los anticuerpos, lo que permite afirmar que el centro activo de la enzima no participa en esta reacción inmunológica.

La precipitación de los antígenos hepático y eritrocítico por sus antisueros homólogos y heterólogos revela un estrecho parentesco estructural entre las proteínas con actividad arginásica presentes en ambos antígenos. La proporción de arginasa precipitada en estas reacciones demuestra, además, que los anticuerpos formados se distinguen por cierta especificidad relativa dirigida contra la arginasa del antígeno que ha ocasionado su aparición.

La comparación de la actividad inmunológica de las precipitinas remanentes de los antisueros que han sido parcialmente absorbidos con diferentes dosis de uno u otro antígeno, demuestra que cada antígeno sustrae del antisuero preferentemente su anticuerpo homólogo.

De los resultados de estos experimentos puede concluirse que las proteínas enzimáticas con actividad arginásica extraídas y purificadas de hígado y de eritrocitos humanos poseen distintos residuos en sus determinantes antigénicos y en consecuencia no son estructuralmente idénticas.

Esta disparidad sugiere que la arginasa del

hígado y la arginasa del eritrocito son productos de síntesis independientes en sistemas celulares que poseen la misma dotación genética pero distinta funcionalidad.

**INTRODUCCIÓN**

Estudios anteriores (1) sobre la cinética de preparaciones purificadas de arginasa (L-arginin ureohidrolasa 3.5.3.1) provenientes de hígado o de eritrocitos humanos, mostraron que las curvas de progreso, de actividad en función del pH, de estabilidad, de influencia de la concentración de sustrato y de activación por cationes bivalentes, son muy semejantes. Las constantes de Michaelis y los valores de la energía de activación no difieren significativamente.

Para alcanzar una conclusión decisiva respecto a la identidad o no identidad de las enzimas con actividad arginásica presentes en el hígado y en los eritrocitos humanos, se ha considerado necesario examinar sus propiedades inmunoquímicas.

Con tal propósito hemos estudiado la neutralización de la actividad y la precipitación de ambas proteínas enzimáticas por los anticuerpos que aparecen en el suero de conejos inmunizados con preparaciones de arginasa hepática o de arginasa eritrocítica.

**PROCEDIMIENTO**

*Antígenos.* Se usaron como antígenos preparaciones de arginasa de hígado y de eritrocitos humanos obtenidas mediante una técnica

\* Esta investigación fue financiada por la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Proyecto 62-19) y por la Fundación Rockefeller (Grant 60033), según un programa conjunto.

ca similar a la que Roholt y Bagot emplearon para purificar la arginasa del hígado de caballo (2). Las preparaciones de arginasa hepática (antígeno H) tenían 80-120 unidades por mg de proteína y las de eritrocitos (antígeno E), 4-8 unidades por mg de proteína.

*Inmunización del conejo.* El suero contra el antígeno H (suero anti H) se preparó inoculando conejos de 2,5 kg con una dosis total de 12 mg de antígeno H. El suero contra el antígeno E (suero anti E) se preparó inyectando una dosis total de 30 mg de antígeno E. Los conejos recibieron semanalmente una tercera parte de la dosis total emulsionada en 5 ml de solución adyuvante de Freund por las vías subcutánea e intraperitoneal. Los animales fueron sangrados asépticamente 15 días después de la última inyección. Los sueros estériles se conservaron en el refrigerador.

*Métodos inmunológicos.* Las reacciones de neutralización y de precipitación se efectuaron de acuerdo con las técnicas descritas por Cohn (3).

La neutralización de la actividad enzimática se ensayó incubando 0,1 a 1,0 ml de suero con una cantidad constante de antígenos (antígeno H: 25  $\mu$ g; antígeno E: 300  $\mu$ g) de actividad biológica casi equivalente, durante 1 hora a 37°C y manteniéndolo después durante 20 horas en el refrigerador. Al término de este período, se midió la actividad arginásica en la mezcla total, resuspendiendo los precipitados.

Las reacciones de precipitación se practicaron colocando en tubos de centrifuga una cantidad constante de suero (suero anti H: 0,025 ml; suero anti E: 0,10 ml), incubándolos en la forma descrita. Después de centrifugar, se separaron los sobrenadantes y los precipitados se lavaron con 3,0 ml de NaCl 0,15 M. Para medir la actividad arginásica se utilizaron 0,1 a 0,5 ml de sobrenadante; los precipitados se resuspendieron en volúmenes apropiados de solución salina. Los valores expresados en unidades de arginasa (micromoles de urea por minuto) se refirieron al volumen total de incubación.

En otra serie de experimentos, los anticuerpos de los sueros fueron parcialmente absorbidos por sus antígenos homólogo o heterólogo, y los anticuerpos residuales que quedaron en los sobrenadantes se probaron con diferentes cantidades de antígeno.

*Determinación de arginasa.* La actividad ar-

ginásica se midió utilizando la técnica ya descrita (1), en las mezclas totales, en los precipitados y en los sobrenadantes convenientemente diluidos. La acción de la enzima no excedió un 10% de hidrólisis del sustrato.

## RESULTADOS

### *Influencia del anticuerpo sobre la actividad arginásica del antígeno. Pruebas de Neutralización.*

La actividad arginásica de los antígenos no cambia significativamente después de la incubación con suero normal de conejo o con los antisueros homólogo y heterólogo. En la Fig. 1 se representa la actividad arginásica de las mezclas de antígeno H con suero normal y con suero anti H. La enzima fue incubada con el sustrato a pH 8,9 (amortiguador glicocola) y a pH 7,4 (amortiguador tris). La actividad arginásica disminuyó un 15 a 18% en las mezclas de antígeno y antisuero, proporción que fue constante e independiente del volumen de antisuero agregado. Esta reducción parcial y no progresiva de la actividad arginásica puede ser explicada como consecuencia de redispersión incompleta de la enzima precipitada.

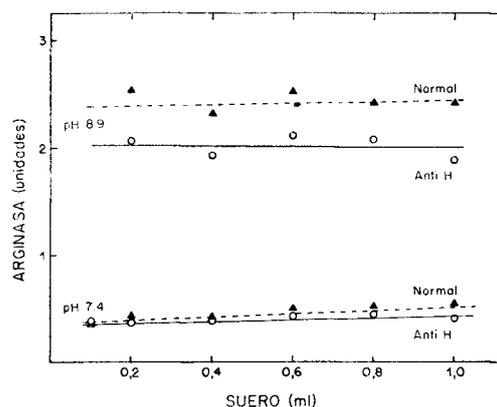


FIG. 1. Influencia del suero normal de conejo y del suero anti H sobre la actividad arginásica del antígeno H. (60  $\mu$ g de antígeno H se incubaron con volúmenes variables de suero).

Resultados coincidentes se obtuvieron incubando antígeno E con suero anti E, o cualquiera de los antígenos con el anti-suero heterólogo.

*Ensayo cuantitativo de las precipitinas anti-arginasa.*

Tanto la arginasa del antígeno H como la del antígeno E fueron precipitadas por su correspondiente antisuero y por el antisuero heterólogo.

Debido al empleo de preparaciones purificadas de arginasa —y no de proteínas cristalinas y puras— los antisueros contenían anticuerpos inespecíficos, dirigidos contra las proteínas contaminantes. La mayor parte de los anticuerpos inespecíficos puede ser eliminada, absorbiéndolos con las proteínas del suero humano normal (4). Esta preabsorción de los antisueros permite depurar las curvas de precipitación de arginasa y obtenerlas en las formas típicas que aparecen en las Figs. 2 y 3. Empleando los antisueros nativos, no absorbidos, se obtuvieron curvas muy anchas, con una extensa meseta de precipi-

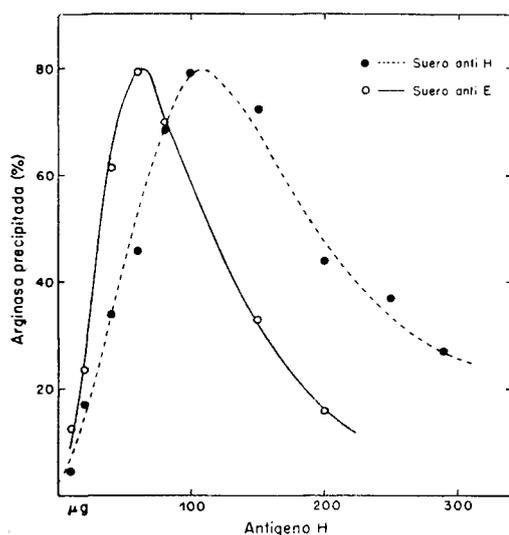


FIG. 2. Curvas de precipitación de la arginasa del antígeno H por los sueros anti H y anti E preabsorbidos con suero humano normal (0.10 ml de antisuero incubado con volúmenes variables de antígeno H).

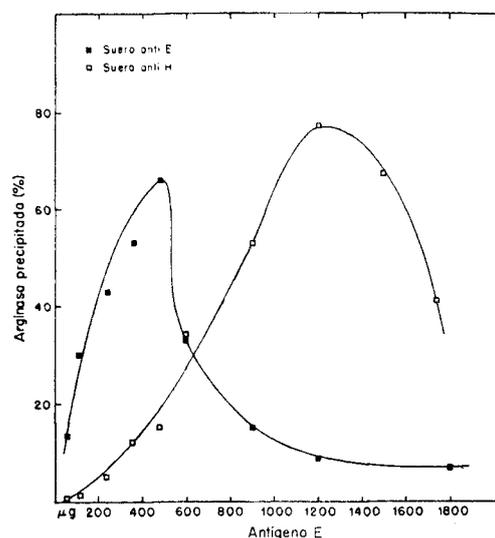


FIG. 3. Curvas de precipitación de la arginasa del antígeno E por los sueros anti H y anti E preabsorbidos con suero humano normal (0.10 ml de antisuero incubados con volúmenes variables de antígeno E).

tación, que es propia de las mezclas de anticuerpos. Los sueros no absorbidos precipitaron en forma casi completa (98%) la arginasa de los antígenos por un efecto de coprecipitación. Con los sueros preabsorbidos, en cambio, una mayor cantidad de arginasa permaneció en solución y la fracción precipitada no sobrepasó un 80% de la arginasa presente.

Para obtener cifras de actividad arginásica equivalentes y mensurables, el suero anti H, más rico en precipitinas anti-arginasa, se diluyó en proporción de 1:4, ajustándolo así al contenido del suero anti E, que se empleaba sin diluir. Las reacciones de precipitación con antígeno E —cuya actividad específica es 10 veces menor que la del antígeno H— requirieron cantidades 10 veces mayores de aquel antígeno.

Las reacciones se efectuaron con antisueros absorbidos con suero humano normal y se determinó la distribución de la actividad arginásica en los precipitados y en los sobrenadantes, desde la región de exceso de anticuerpo hasta la región de exceso de antígeno.

TABLA I

*Precipitación de arginasa hepática o eritrocítica por los anticuerpos de 1,0 ml de suero de conejos inmunizados con preparaciones purificadas de arginasa*

	Antígeno		Actividad en la	Actividad en el precipitado	
	mg/ml		mezcla incubada	U totales	%
	(1)		(2)	(3)	(4)
I. Suero Anti H:					
Equiv. (*)	H	1,6	18,8	13,6	72
	E	24,0	28,0	13,6	49
P. máx. (**)	H	4,0	72,0	32,0	44
	E	48,0	77,0	30,4	39
II. Suero Anti E:					
Equiv. (*)	H	0,4	11,4	6,1	54
	E	2,4	6,4	4,3	67
P. máx. (**)	H	0,6	17,9	8,0	45
	E	4,8	13,5	6,6	49

(\*) *Equivalencia*: mg de antígeno que precipitan los anticuerpos de 1,0 ml de antisuero, dejando el menor exceso de arginasa y de anticuerpos anti-arginásicos en el sobrenadante.

(\*\*) *Precipitación máxima*: mg de antígeno que incubados con 0,1 ml de antisuero rinden la mayor actividad arginásica en el precipitado.

En las mezclas de antígeno H y suero anti H, los sobrenadantes contenían el menor exceso de arginasa y de su anticuerpo cuando la razón mg de antígeno/ml de anticuerpo fue 1,6. Este punto central de equivalencia se encontraba separado del punto de precipitación máxima que correspondía a una razón 4.

En las incubaciones de antígeno E con suero anti E, el punto central de equivalencia corresponde a una razón 2,4 y el de precipitación máxima a una razón 4,8.

Estos resultados aparecen en las Figs. 2 y 3, donde también se representan las reacciones de precipitación entre antisueros y antígenos heterólogos. El suero anti H posee una alta actividad precipi-

tante sobre la arginasa contenida en el antígeno E. La zona en que el exceso de arginasa y anticuerpo es menor corresponde a una relación de 24 mg de antígeno E por 1 ml de antisuero H y el punto de máxima precipitación a una razón 48.

El suero anti E —originalmente más rico en anticuerpos inespecíficos— tiene una acción precipitante baja sobre el antígeno H. La zona de equivalencia correspondió a una razón 0,4 y el punto de precipitación máxima a una razón 0,6.

Estos resultados están resumidos en la Tabla I, en la cual se indica la cantidad total de arginasa presente en las diferentes mezclas de incubación, la fracción de la enzima combinada a los anticuerpos y

la proporción en que uno y otro suero precipitaron la actividad arginásica de uno y otro antígeno, a nivel de las regiones de equivalencia y de precipitación máxima. En ella puede observarse que, a pesar de la intensa precipitación heteróloga, los anticuerpos propios de cada antisuero poseen una relativa especificidad. El suero anti H precipitó regularmente una mayor proporción de arginasa de su antígeno H homólogo, que de su antígeno E heterólogo. Por el contrario, el suero anti E precipitó en mayor proporción arginasa eritrocítica que arginasa hepática.

*Absorción parcial de los anticuerpos con antígeno homólogo o heterólogo.*

La absorción selectiva de uno de los anticuerpos existentes en un suero de estructura inmunitaria compleja por un antígeno definido que lo extrae, permite identificar y distinguir anticuerpos similares que dan reacciones cruzadas. La absorción parcial modifica las razones en que los diversos anticuerpos están presentes en el antisuero nativo. Pollock (5)

hizo una brillante aplicación de este método cuando demostró la identidad de las penicilinasas constitutiva e inducida de la cepa 569 de *Bacillus cereus* y su no identidad con la penicilinasa constitutiva de otras cepas.

a) *Absorción parcial de los anticuerpos del antisuero H por el antígeno H.* El ensayo se efectuó incubando 1,0 ml de antisuero H no absorbido con 50 o 250  $\mu\text{g}$  de antígeno H y determinando en los sobrenadantes la acción de los anticuerpos remanentes. Con este objeto, una vez separados los precipitados, se analizó la presencia de precipitinas anti-arginasa residuales en diversos volúmenes de los sobrenadantes e incubados con 25  $\mu\text{g}$  de antígeno H o con 125  $\mu\text{g}$  de antígeno E. Los resultados (Fig. 4 A) muestran que el antígeno H absorbió preferentemente la precipitina antiarginásica hepática y en escala más restringida la precipitina antiarginasa eritrocítica.

b) *Absorción parcial de los anticuerpos del antisuero E por el antígeno E.* Experimentos similares se efectuaron absor-

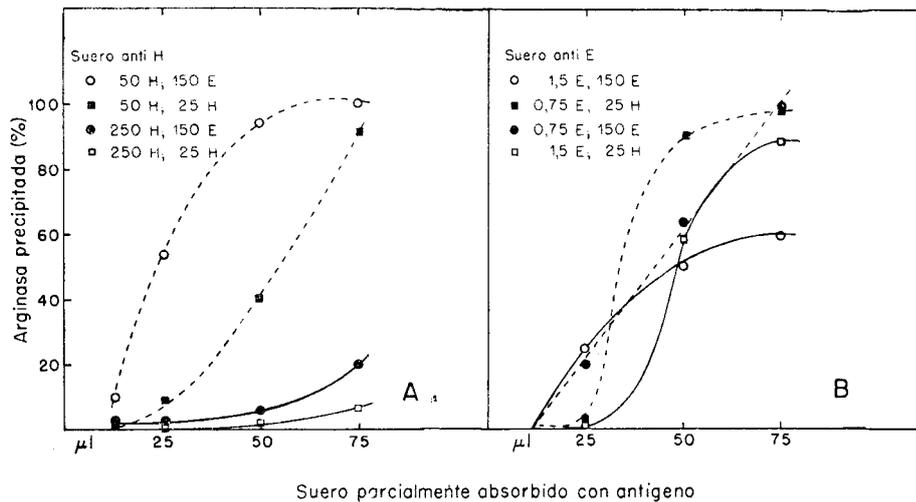


FIG. 4. Tanto por ciento de arginasa precipitada por los anticuerpos que quedan en los sobrenadantes de antisueros que han sido parcialmente absorbidos por sus antígenos homólogos. Los sobrenadantes fueron ensayados con 25  $\mu\text{g}$  de antígeno H o con 150  $\mu\text{g}$  de antígeno E. A) suero anti H absorbido con 50 o 250  $\mu\text{g}$  de antígeno H por ml de suero. B) suero anti E absorbido con 0,75 o 1,5 mg de antígeno E por ml de suero.

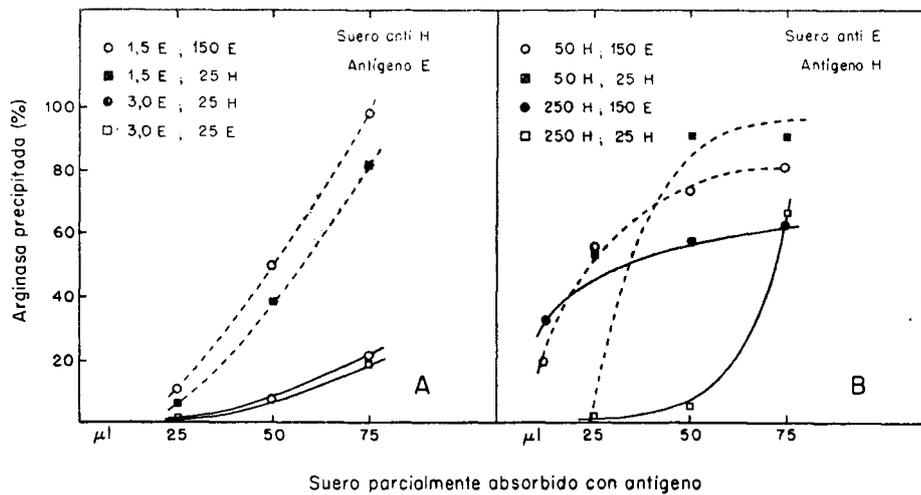


FIG 5. Tanto por ciento de arginasa precipitada por los anticuerpos que quedan en los sobrenadantes de antisueros que han sido parcialmente absorbidos por sus antígenos heterólogos. Los sobrenadantes fueron ensayados con 25 µg de antígeno H o con 150 µg de antígeno E. A) suero anti H absorbido con 1,5 o 3,0 mg de antígeno E por ml de suero. B) suero anti E absorbido con 25 o 250 µg de antígeno H por ml de suero.

biendo los anticuerpos de 1,0 ml de anti-suero E con 0,75 o con 1,5 mg de antígeno E. En diversos volúmenes de los sobrenadantes se analizó la proporción de anticuerpos residuales incubándolos con 25 µg de antígeno H o con 125 µg de antígeno E. Los resultados (Fig. 4 B) muestran que cuando se emplearon volúmenes adecuados de sobrenadantes (correspondientes a más de 50 µl de antisuero) que contenían una cantidad suficiente de anticuerpos residuales, el antígeno E absorbió en mayor proporción los anticuerpos dirigidos contra arginasa eritrocítica.

c) *Absorción parcial cruzada de los anticuerpos del antisuero H por el antígeno E.* La absorción se practicó incubando 1,0 ml del suero anti H con 1,5 o con 3,0 mg de antígeno E. Los anticuerpos contenidos en diversos volúmenes de los sobrenadantes se prueban en su acción precipitante sobre 25 µg de antígeno H o 125 µg de antígeno E. La absorción de los anticuerpos del suero anti H con 3 mg de antígeno E fue casi completa. Empleando como absorbente 1,5 mg de antígeno E, los anticuerpos residuales contenían una mayor proporción de precipitinas diri-

das contra la arginasa eritrocítica que contra la arginasa hepática (Fig. 5 A). Sin embargo, si se comparan estos valores con los de la absorción homóloga (Fig. 4 A) se aprecia que el antígeno E posee, en todo caso, una capacidad absorbente ligeramente superior para las precipitinas anti-eritrocíticas.

d) *Absorción parcial cruzada de los anticuerpos del antisuero E por el antígeno H.* Cuando 1 ml de suero anti E fue absorbido por 250 µg de antígeno H, los anticuerpos contra la arginasa hepática fueron removidos específicamente y el suero quedó proporcionalmente enriquecido en anticuerpos contra la arginasa eritrocítica. El resultado fue notable cuando se ensayaron volúmenes de sobrenadantes equivalentes a 12,5-50 µl del antisuero nativo. El mismo fenómeno, menos pronunciado, se observó cuando se eliminaba una menor cantidad de anticuerpos, empleando 25 µg de antígeno H (Fig. 5 B).

Las observaciones anteriores señalan que el uso de la técnica de las absorciones parciales es delicado. Las relaciones entre el antígeno absorbente y los anti-

cuerpos absorbidos deben ser ensayadas empíricamente, procurando ubicar la zona crítica en que la remoción selectiva de anticuerpos similares se manifiesta en forma que permite una discriminación.

#### DISCUSIÓN

Las propiedades enzimológicas de la arginasa hepática y de la arginasa eritrocítica son muy parecidas (1). Con el propósito de establecer con precisión la identidad o no identidad estructural de estas enzimas, se recurrió al estudio de sus propiedades inmunológicas. El análisis tiene como limitación el carácter de los antígenos empleados, que fueron preparaciones purificadas de arginasa —y no enzimas puras— que evocan en el conejo la producción de un anticuerpo específico antiarginasa y de otros anticuerpos dirigidos contra las proteínas contaminantes. Esta dificultad puede ser superada en parte mediante la depuración de los antisueros absorbiendo los anticuerpos inespecíficos con las proteínas del suero normal que no contiene arginasa. Por otro lado, la alta actividad enzimática de los antígenos permite determinar en forma específica su componente arginasa, pues se dispone de un método preciso y sensible para medir la actividad de la enzima.

La arginasa no se inactiva cuando se combina con los anticuerpos homólogos y heterólogos. Los resultados obtenidos ensayando la actividad enzimática a pH 8,9, se repitieron y confirmaron ensayándola a pH 7,4 con el objeto de evitar una posible influencia de un medio fuertemente alcalino sobre la disociación del complejo antígeno-anticuerpo. Por consiguiente, los grupos que determinan la antigenicidad de la molécula enzimática son distintos de los grupos que constituyen su centro activo.

Las pruebas de precipitación demues-

tran que los anticuerpos producidos en el conejo por cualquiera de los antígenos, precipitan tanto la arginasa hepática como la arginasa eritrocítica. La forma de las curvas de precipitación sugiere que el antisuero E (preabsorbido con suero normal) tiene menor cantidad de anti-arginasa que el antisuero H preabsorbido, pero que en aquél este anticuerpo se encuentra más puro, mezclado con menor número y cantidad de anticuerpos inespecíficos.

La distribución de la arginasa en los precipitados y en los sobrenadantes indica que el complejo antígeno-anticuerpo es soluble en exceso de antígeno y es incompletamente precipitado en exceso de anticuerpos. Esta última característica, que es propia de las reacciones de floculación en suero de caballo, no tiene una explicación clara. Es posible que la presencia de otros anticuerpos y otros complejos modifique la disociación del complejo arginasa-antiarginasa o que este último sea relativamente soluble en exceso de anticuerpos.

El análisis de la acción precipitante de cada antisuero sobre la arginasa homóloga y heteróloga (Tabla I) a nivel de regiones próximas a la equivalencia y a la precipitación máxima, revela que cada antisuero precipita regularmente una proporción más alta de su arginasa homóloga y una proporción más baja de la arginasa heteróloga. Estos resultados sugieren que los anticuerpos provocados en el conejo por la inoculación de preparados de arginasa hepática o eritrocítica no son idénticos, a pesar de que presentan una estrecha similitud y dan reacciones cruzadas.

Esta conclusión aparece reforzada por el análisis de los experimentos de absorción parcial de los anticuerpos, que se hicieron empleando dos dosis de antígeno, y comparando, en un segundo tiempo, la acción precipitante de los anticuerpos residuales sobre la arginasa hepática y la

arginasa eritrocítica. Los efectos de la absorción de cada antisuero con su antígeno homólogo o heterólogo demuestran que existe una selectividad relativa, es decir, que un determinado antígeno remueve del antisuero una mayor proporción de su anticuerpo homólogo que del anticuerpo heterólogo. Sin embargo, si se emplean cantidades suficientemente altas de antígenos, sobreviene una eliminación completa de los anticuerpos tanto homólogos como heterólogos.

El conjunto de estos resultados sugiere fuertemente que las proteínas enzimáticas con actividad arginásica producidas en el hígado y en los glóbulos rojos humanos, no diferenciables por sus propiedades cinéticas, son, sin embargo, proteínas que difieren en algún detalle de su estructura molecular, a nivel de sus determinantes antigénicos.

Con el objeto de cimentar esta conclusión, se continuará el análisis inmunológico de estas proteínas, empleando métodos de mayor poder resolutivo, como la inmunodifusión y la inmunoelectroforesis en gel de agar.

#### SUMMARY

The kinetic properties of liver and erythrocyte human arginases are quite similar. In order to make clear the identity or non identity of these enzymatic proteins, immunochemical studies were undertaken. Immune sera were produced in rabbits by the injection of purified preparations of arginase extracted either from human liver or red blood cells. Non specific antibodies produced by the contaminant proteins in the preparations can be substantially removed by preabsorption of the antisera with human normal serum. Antibodies against arginase were purified following this procedure.

Antiserum against either hepatic antigen or erythrocyte antigen precipitated the arginase existing in these antigens. Anti-H serum is richer in arginase antibodies than anti-E serum (Table I, column 2).

Arginase was not inactivated by combinations with homologous or heterologous antibodies (Fig. 1) suggesting that the active center of the enzyme is not implicated in this immunological reaction.

The quantitative precipitation of liver or erythrocyte antigens by their homologous or heterologous antisera (Figs. 2 and 3) indicates a close relationship between the molecular structure of these arginases. Notwithstanding, analyses of the direct and crossed reactions at the equivalence and maximal precipitation zones demonstrated that the antibodies present in each serum are preferentially active against homologous arginase.

Partial absorption of antibodies by their homologous or heterologous antigens also yielded consistent results (Figs. 4 and 5). Hepatic antigen added to any antisera removed predominantly the antibody directed against liver arginase. Erythrocyte antigen, on the other hand, removed preferentially the antibody combining with erythrocyte arginase.

These experimental results allow to conclude that proteins with arginase activity extracted and purified from human liver and erythrocytes have different amino acid residues in their antigenic determinants, and that, in consequence, they are not structurally identical.

The non identity of liver and erythrocyte arginase suggests that these enzymes are independently synthesized in cellular systems endowed with the same genetic constituents in different functional activities.

## REFERENCIAS

- 1.—CABELLO, J., BASILIO, C. y PRAJOUX, V. *Biochim. Biophys. Acta* **48**:148, 1961.
- 2.—ROHOLT, O. A. y BAGOT, A. E. — En "The Enzymes", J. B. Sumner y K. Myrbak, Ed., Vol. I, Part II, p. 905, Academic Press, New York, 1951.
- 3.—COHN, M. — En "Methods in Medical Research", Vol. 5, Section III, p. 301. The Year Book Publishers, Chicago, 1952.
- 4.—MOUDGAL, N. R. y LI, C. H. — *Arch. Biochem.* **93**:122, 1961.
- 5.—POLLOCK, M. R. — *J. Gen. Microbiol.* **14**:90, 1956.