

## RESUMEN

Hasta hace muy poco tiempo se pensaba que la agmatina, compuesto resultante de la descarboxilación de la arginina, sólo se encontraba en microorganismos y plantas. Sin embargo recientemente se ha demostrado su presencia en algunos tejidos de mamíferos, especialmente en cerebro y también se han descrito algunas de sus posibles funciones. Entre estas funciones se destacan la estimulación de la liberación de catecolaminas e insulina y el aumento de la presión arterial. A nivel cerebral, se la ha descrito como ligando de receptores de imidazolina tipo I y II, de receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos y como estimulante de la liberación de hormonas hipotalámicas, por lo que se la ha definido como un neurotransmisor. Sin embargo, aún no se conocen las bases moleculares de los efectos observados, aunque resulta muy sugerente el efecto inhibitor de la agmatina sobre todas las formas de óxido nítrico sintasa (NOS), lo que ha llevado a postular que este compuesto podría actuar como regulador endógeno de los niveles de óxido nítrico.

Muchas de las interrogantes acerca de la real participación de la agmatina en la función cerebral normal aún no tienen una respuesta clara, debido en parte al escaso conocimiento que se tiene acerca de los aspectos metabólicos de este compuesto en los mamíferos. Aunque se ha demostrado la conversión de agmatina en putrescina en el cerebro, la incertidumbre es tal que, ha sido explicada tanto por acción de una agmatinasa, como por una arginasa presente en este tejido. A pesar que, recientemente se ha comunicado el clonamiento de una agmatinasa humana, la actividad de la proteína recombinante es extraordinariamente baja y se encuentra en los límites de detección de los métodos empleados para medirlas.

Considerando las acciones biológicas que se le han asignado a la agmatina y especialmente su posible acción como neurotransmisor y como una manera de contribuir al conocimiento del metabolismo de la agmatina, en este trabajo hemos propuesto que una agmatinasa participa en la regulación de los niveles de agmatina y por lo tanto de las acciones moduladoras de este metabolito en el cerebro de la rata. Específicamente, el presente trabajo de tesis doctoral tuvo los siguientes objetivos: 1) Demostrar la existencia de la agmatinasa en el cerebro de la rata y encontrar una explicación para los bajos niveles de actividad reportados en la literatura. 2) Aislar y secuenciar el gen de la agmatinasa de cerebro de rata, mediante análisis de una genoteca de cDNA. 3) Expresar el gen de la agmatinasa en células de *E. coli* y purificar la enzima recombinante. 4) Caracterizar la enzima recombinante.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen en forma significativa al conocimiento del metabolismo de la agmatina en cerebro, en varios aspectos fundamentales. (a) Se detectó actividad agmatinasa en el cerebro de la rata y a pesar que esta fue muy baja, se pudo corroborar la presencia de la proteína mediante inmunodetección en cuerpos neuronales y en células gliales, especialmente en la zona del hipotálamo. (b) Se detectó, se purificó parcialmente y se caracterizó una actividad inhibidora de agmatinasa presente en el cerebro de la rata. Esta actividad se une reversiblemente a la enzima, depende del ion metálico  $Mn^{2+}$  y no es excluyente con el producto de la reacción, putrescina. No descartamos que corresponda a la misma agmatinasa y sugerimos que podría explicar en parte la baja actividad agmatinasa detectada en cerebro. (c) El análisis de una genoteca de cDNA de cerebro de rata, permitió identificar dos clones con una alta actividad agmatinasa (10  $\mu$ moles urea/h/mg de proteína). La proteína codificada por este cDNA se expresó y purificó a homogeneidad, la cual posee un peso aproximado de 58 KDa, que corresponde al tamaño deducido desde la secuencia nucleotídica.

La proteína fue detectada por un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de 6 histidinas, las que fueron adicionadas al extremo amino de la proteína para facilitar su purificación. La enzima purificada tiene un pH óptimo de 9,0, una  $K_m$  de  $2 \pm 0,2$  mM para agmatina y requiere de iones metálicos, especialmente  $Mn^{2+}$  para su actividad catalítica, siendo sus características muy similares a las descritas para la enzima de *E. coli*. A pesar de esta similitud funcional la identidad de secuencia aminoacídica con la agmatinasa de *E. coli* y la humana es sólo de un 10 %. Contrariamente a lo esperado, la agmatinasa de rata no contiene los residuos conservados que son característicos de la familia de las arginasas y que participan en la unión del metal, en la unión del sustrato y en la catálisis misma. Esto es muy contradictorio, pues los genes de agmatinasa de mamíferos descritos hasta el momento codifican para proteínas que poseen estos residuos, pero son prácticamente inactivas desde el punto de vista enzimático.

