

Estudio de los N-formil y N-yodoacetil derivados de la L-ornitina y de la L-lisina, como posibles inhibidores de la arginasa

RODRÍGUEZ-PÁEZ, L.*, NERI, C.D.*, BAEZA, R.I.* y WONG, R.C.*

Departamento de Bioquímica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN
Prol. de Carpio y Plan de Ayala
Col. Sto. Tomás
Apartado Postal 42-186
11340 México, D.F.

RODRÍGUEZ-PÁEZ, L., C.D. NERI, R.I. BAEZA y R.C. WONG, 1997. Estudio de los N-formil y N-yodoacetil derivados de la L-ornitina y de la L-lisina, como posibles inhibidores de la arginasa. *An. Esc. nac. Cienc. biol.*, Méx., **42**: 11-20.

RESUMEN: Con la idea de obtener información referente a la topología del sitio activo de la arginasa, se hizo un estudio comparativo del posible efecto inhibitorio de la δ -N-yodoacetil ornitina, δ -N-formil ornitina, ϵ -N-yodoacetil lisina y ϵ -N-formil lisina, sobre la arginasa de hígado de rata. De las cuatro sustancias estudiadas, sólo la δ -N-formil ornitina inhibió competitivamente a la arginasa de hígado de rata. Nuestros estudios sugieren que esta arginasa no presenta tolerancia de grupos químicos voluminosos en las proximidades del grupo δ -amino de la ornitina en el complejo enzima-sustrato, ya que los derivados yodoacetilados estudiados, con grupos voluminosos en esa posición, no entran al sitio activo de la enzima, en tanto que la δ -N-formil ornitina, con un grupo formilo pequeño sí entra, puesto que compite por el sitio activo de la arginasa, inhibiéndola. La distancia entre los dos grupos amino del inhibidor también es importante, ya que al aumentar un átomo de carbono a la δ -N-formil ornitina se pierde la afinidad por el sitio activo y ya no hay inhibición.

INTRODUCCIÓN

Las poliaminas, putrescina, espermidina y espermina, son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, con carga positiva y que se encuentran en todas las células, ya sea animales, vegetales o bacterias (Tabor y Tabor, 1976). Debido a su carga positiva, las poliaminas se unen fuertemente a los ácidos nucleicos y a otros constituyentes celulares con carga negativa (Tabor y Tabor, 1964, 1976; Schuber, 1989; Balasundaram y Tyagi, 1991). Estas aminas son esenciales para un crecimiento y diferenciación normal de células procarióticas y eucarióticas. Esto se ha apoyado por experimentos en los que la síntesis de

* Becarios de la DEDICT-COFAA y EDD.

las poliaminas se encuentra bloqueada, ya sea por mutaciones o por el uso de inhibidores, lo cual impide el crecimiento y la diferenciación celular, a menos que se adicionaran poliaminas exógenas (Heby, 1981; Tabor y Tabor, 1985). Estos hallazgos han incrementado el interés en la posibilidad de que los inhibidores de la síntesis de las poliaminas pudieran ser usados como agentes quimioterapéuticos, en una variedad de enfermedades caracterizadas por una gran proliferación celular, como el cáncer y enfermedades parasitarias (He *et al.*, 1995; Marton y Pegg, 1995; Pegg, 1988; Seiler, 1991).

Los principales precursores de las poliaminas son la ornitina y la metionina. La putrescina se forma a partir de la ornitina por la acción de la ornitina descarboxilasa (ODC). La ornitina usada como sustrato por esta enzima, puede provenir del plasma o de la arginina intracelular, por medio de la acción de la arginasa (Nikolic, *et al.*, 1993; Ouzounis y Kyripides, 1994). La arginasa extrahepática se conoce desde hace muchos años y puede ser considerada como parte de la vía biosintética de las poliaminas (Fuentes *et al.*, 1994; Jenkinson y Grigor, 1994; Reczkowsky y Ash, 1994), por lo que es posible que la inhibición de la arginasa, conduzca a una disminución de la síntesis de las poliaminas, con la consecuente disminución de la proliferación celular.

En este trabajo se estudia el efecto de la δ -N-yodoacetil ornitina, ϵ -N-yodoacetil lisina, δ -N-formil ornitina y ϵ -N-formil lisina, sobre la actividad de la arginasa, ya que el producto de la reacción catalizada por la arginasa es la ornitina, y es posible que estas cuatro sustancias, análogos de la ornitina, inhiban a la arginasa por su similitud estructural con la ornitina y con la arginina, que es el sustrato natural de esta enzima. Como se puede ver, se trata de dos derivados de la ornitina, uno con grupo formilo pequeño y no alquilante, y el otro con un grupo yodoacetilo voluminoso y alquilante, así como de dos derivados de la lisina, uno con un grupo formilo pequeño y no alquilante, y el otro con un grupo yodoacetilo voluminoso y alquilante. Además, se seleccionaron dos derivados de la L-ornitina con cinco átomos de carbono, como el sustrato, y dos derivados de la L-lisina, con seis átomos de carbono, para determinar la influencia de incrementar la cadena hidrocarbonada en un átomo de carbono.

En resumen, se comparan cuatro posibles inhibidores, con características estructurales estratégicamente seleccionadas para obtener información sobre la topología del sitio activo de la arginasa. Con esto, se espera tener información sobre las características estructurales que deben tener los posibles inhibidores de esta enzima para lograr una mejor interacción con el sitio activo, y por lo tanto, mejor efecto inhibitorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar machos o hembras de aproximadamente 200 a 250 g de peso. Ninhidrina de Merck. Albúmina bovina, p-nitrofenol, urea, diacetilmonoxima, N,N'-dodiclohexil carbodiimida y arginasa de hígado de bovino de Sigma Chemical Co. Reactivo de Folin, de Sigma-México. Amberlita IRC-50, de Mallinckrodt. Los demás reactivos utilizados fueron químicamente puros.

Síntesis de la δ -N-formil ornitina y de la ϵ -N-formil lisina

La síntesis de la δ -N-formil ornitina (N-FO) y de la ϵ -N-formil lisina (N-FL) fue descrita por Okawa y Hase (1963) quienes emplearon estas sustancias como intermediarios quími-

cos en la síntesis de péptidos. La N-FO se obtuvo cristalina, con un rendimiento del 56% y un punto de fusión de 217°C (descomposición). Ambas determinaciones concuerdan con lo informado por Okawa y Hase (1963). La N-FL se obtuvo como un producto cristalino con un rendimiento del 38% y un punto de fusión de 225-226°C (descomposición). Lo cual concuerda también con lo informado por Okawa y Hase (1963).

Síntesis de la δ -N-yodoacetil-L-ornitina y de la ϵ -N-yodoacetil-L-lisina

La síntesis de la δ -N-yodoacetil ornitina (N-YAO), se hizo de acuerdo con el método informado por Okawa y Hase (1963), ligeramente modificado por Oliver (1980), obteniéndose un producto con un punto de fusión de 182°C y un rendimiento de 49%. Tanto el punto de fusión como el rendimiento, concuerdan con el informado por Oliver (1980). La síntesis de la ϵ -N-yodoacetil lisina (N-YAL), se hizo de acuerdo con el método informado por Okawa y Hase (1963), ligeramente modificado por Iraola (1985). Se obtuvo un producto de color blanco, con un punto de fusión de 184°C y un rendimiento de 65%. Tanto el punto de fusión como el rendimiento, concuerdan con el informado por Iraola (1985).

Determinación de la actividad de la arginasa de hígado de rata

a) Aislamiento de la arginasa

Se empleó el método de Schimke (1964). Se sacrificó una rata por dislocación cervical y se le extrajo el hígado. Se lavó con agua fría y se pesó lo más rápido posible. Se cortó en pedazos pequeños y se homogeneizó en tres volúmenes de regulador Tris.HCl 10 mM, pH 7.5, con KCl 0.15 M y MnCl₂ 0.05 M. Se centrifugó a 12,000 \times g. Se pasó el sobrenadante resultante por manta de cielo húmeda para eliminar la grasa y luego se calentó 20 min a 60°C. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 \times g. El precipitado se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 105,000 \times g por 60 min. Al sobrenadante obtenido se le adicionó sulfato de amonio sólido hasta una concentración del 70% y el precipitado resultante fue redissuelto en un volumen pequeño de regulador Tris.HCl 10 mM, pH 7.5, que se guardó en congelación a -20°C hasta su uso. Esta fue la solución enzimática (16 mg/ml) que se utilizó en todos los experimentos de este trabajo cuya actividad específica fue de 155 μ mol de urea formado/min/mg de proteína.

b) Medición de la actividad enzimática por el método de Tarrab et al., 1974

En tubos de 13 \times 100 mm se mezclaron 0.1 ml de regulador de glicina-NaOH 0.25 mM, pH 9.5; 0.2 ml de L-arginina 125 mM; 0.1 ml de MnCl₂, 2.5 mM, y agua bidesalada necesaria para completar 1 ml. Se preincubó 5 min a 37°C y la reacción se inició por la adición de 0.05 ml de la preparación de arginasa de hígado de rata. Se incubó por 2 min y se detuvo la reacción por la adición de 5 ml de HClO₄, 0.5 M. Se centrifugó por 10 min a 12,000 \times g y se determinó la cantidad de urea presente en el sobrenadante. Se adicionó un testigo de enzima inactivada.

Una unidad de enzima se define como la cantidad de arginasa necesaria para producir la formación de 1 μ mol de urea por minuto de incubación a 37°C bajo las condiciones del ensayo (Tarrab et al., 1974).

c) Determinación de urea por el método de Rahmatullah et al., 1980*Reactivos*

- 1) Solución ácido-férrica. Se adicionaron 100 ml de ácido fosfórico concentrado (85%, $d=1.67$) a 300 ml de ácido sulfúrico concentrado (95-98%, $d=1.84$) y 600 ml de agua destilada. Se disolvieron 100 mg de cloruro férrico en esta solución.
- 2) Solución de diacetilmonoxima (DAMO)-tiosemicarbazida (TSC). Se disolvieron 500 mg de DAMO y 10 mg de TSC en agua destilada y se diluyeron a 100 ml.
- 3) Reactivo cromogénico. Se mezclaron dos partes del reactivo 1 con una parte del reactivo 2 inmediatamente antes de usar.

Procedimiento

Se tomaron 0.05 ml del sobrenadante resultante de la determinación de la actividad de la arginasa de hígado de rata y se mezclaron con 3 ml del reactivo cromogénico. Se agitó vigorosamente y se calentó en un baño de agua hirviendo por 5 min. Se enfrió a temperatura ambiente y se leyó la absorbencia a 525 nm contra un blanco de agua destilada y reactivo cromogénico. La cantidad de urea presente, se obtuvo de una curva estándar, de 0-150 nmoles.

RESULTADOS**Efecto de la δ -N-yodoacetil ornitina, δ -N-formil ornitina, ϵ -N-yodoacetil lisina y ϵ -N-formil lisina sobre la actividad de la arginasa de hígado de rata**

Debido a que la ornitina, necesaria para la síntesis de las poliaminas, es el producto de la acción de la arginasa (la última enzima del ciclo de la urea), exploramos la posibilidad de que la N-FO, la N-FL, la N-YAO y la N-YAL, por ser análogos estructurales de la ornitina, fueran capaces de inhibir a la arginasa de hígado de rata, y si alguna de estas sustancias inhibiera a la arginasa, se esperaría también una inhibición de la biosíntesis de las poliaminas.

La realización de los estudios cinéticos sobre la arginasa de hígado de rata se hizo con una solución enzimática parcialmente purificada por nosotros, de acuerdo con el método de Schimke (1964), y los resultados que obtuvimos con esta preparación son reproducidos con la arginasa de hígado de bovino comercial. Los resultados representan el promedio de por lo menos tres determinaciones.

Efecto de la δ -N-yodoacetil ornitina sobre la actividad de la arginasa de hígado de rata

Al estudiar el efecto de la N-YAO sobre la actividad de la arginasa de hígado de rata encontramos que este compuesto no fue capaz de inhibir a la arginasa, aun a concentraciones relativamente altas (Fig. 1). Probablemente porque en esta enzima no hay tolerancia por grupos químicos voluminosos como el yodoacetilo.

Efecto de la ϵ -N-yodoacetil lisina sobre la actividad de la arginasa de hígado de rata

Se determinó la actividad de la arginasa en función de la concentración de N-YAL (Fig. 1) y encontramos que este compuesto prácticamente no inhibe a la arginasa de hígado de rata, ya que a una concentración de 100 mM sólo produjo una inhibición del 10% de la actividad enzimática.

Efecto de la δ -N-formil ornitina sobre la actividad de la arginasa de hígado de rata

Para esta determinación se usaron diferentes concentraciones del inhibidor y se encontró que al aumentar la concentración del inhibidor, aumenta la inhibición, y que de 20 a 60 mM, esta sustancia produjo una buena inhibición de la arginasa de hígado de rata (Fig. 1).

Determinación del tipo de inhibición producido por la δ -N-formil ornitina sobre la actividad de la arginasa de hígado de rata

Se determinó la actividad de la enzima con concentraciones crecientes del sustrato en presencia del inhibidor, y se observó que la actividad de la enzima disminuyó y al trazar estos datos con el método de Lineweaver-Burk (Fig. 2), se produjo una cinética de tipo competitivo, es decir, este inhibidor tiene la capacidad para entrar al sitio activo de la enzima. Sin embargo, la inhibición sólo se logra a concentraciones relativamente altas del inhibidor.

En la figura 3 se muestra la determinación de la constante de inhibición (K_i) para la δ -N-formil ornitina, de acuerdo con el método de Dixon y Webb (1979).

Efecto de la ϵ -N-formil lisina sobre la actividad de la arginasa de hígado de rata

Al estudiar el efecto de la concentración del inhibidor sobre la actividad de la arginasa de hígado de rata, observamos que aún a concentraciones altas del inhibidor (100 mM), prácticamente no se observa efecto inhibidor (Fig. 1).

DISCUSIÓN

La biosíntesis de poliaminas es importante en el metabolismo celular; la ornitina es un precursor de la putrescina y se forma por hidrólisis de arginina con arginasa. Consideramos que algunos compuestos análogos de la ornitina podrían actuar como antimetabolitos en la reacción catalizada por la arginasa y por lo tanto producir inhibición de esta enzima. Es por esto que en este trabajo decidimos hacer un estudio comparativo del posible efecto inhibidor de la δ -N-yodoacetil ornitina, ϵ -N-yodoacetil lisina, δ -N-formil ornitina y ϵ -N-formil lisina, compuestos con características estructurales estratégicamente seleccionadas para tratar de obtener información sobre la topología del sitio activo de la arginasa, que permita anticipar las características estructurales que deben tener los posibles inhibidores de esta enzima, para obtener un mejor efecto inhibidor.

Al hacer estos estudios, se encontró que únicamente la δ -N-formil ornitina inhibe a la arginasa de hígado de rata, en tanto que la δ -N-yodoacetil ornitina no la inhibe, probable-

mente porque el sitio activo de la arginasa no presenta tolerancia de grupos químicos voluminosos como el yodoacetilo. Además, los derivados de la lisina, la ϵ -N-formil lisina y la ϵ -N-yodoacetil lisina, tampoco la inhibieron. Estos hallazgos son importantes porque en estudios *in vivo*, la δ -N-formil ornitina tendría la posibilidad de inhibir la biosíntesis de poliaminas en dos puntos diferentes: A nivel de la arginasa, donde se produce la ornitina y a nivel de la ornitina descarboxilasa, donde se produce la putrescina, con lo que se esperaría un mejor efecto farmacológico. Como se ha demostrado en la inhibición del desarrollo embrionario de la rata por la δ -N-yodoacetil ornitina (Méndez *et al.*, 1986), en ese trabajo se informó inhibición de la arginasa; sin embargo, hemos encontrado que la δ -N-yodoacetil ornitina prácticamente no inhibe *in vitro* a la arginasa del hígado, ni a la del útero de la rata. Pero cuando esta sustancia se aplicó *in situ* en el cuerno uterino de la rata, sí se encontró una fuerte inhibición de la arginasa uterina (Méndez *et al.*, 1986). A la fecha, no se tiene una explicación a este fenómeno.

Estos estudios sugieren que la arginasa de hígado de rata, no admite grupos químicos voluminosos en las proximidades del grupo δ -amino de la ornitina en el complejo enzima-substrato, ya que los derivados yodoacetilados estudiados (con grupos voluminosos en esa posición) no entraron al sitio activo de la enzima, en tanto que la δ -N-formil ornitina (con un grupo formilo pequeño) sí entró, puesto que compite con el substrato por el sitio activo de la arginasa, inhibiéndola. La distancia entre los dos nitrógenos también es importante, ya que la diferencia de un átomo de carbono entre la δ -N-formil ornitina y la ϵ -N-formil lisina, hace que se pierda la afinidad por el sitio activo y ya no hay inhibición. Estos factores deberán tomarse en cuenta cuando se trate de diseñar inhibidores de este tipo, con más capacidad para inhibir a la arginasa.

De acuerdo con lo anterior, la importancia de este trabajo radica en que se ha obtenido información importante sobre la topología del sitio activo de la arginasa, de posible utilidad en el diseño de nuevos inhibidores y además, se ha establecido claramente que la δ -N-formil ornitina inhibe a la arginasa de hígado de rata y en estudios posteriores estudiaremos si la inhibición de esta enzima, conduce a la inhibición de la biosíntesis de las poliaminas. Además, también evaluaremos si la δ -N-formil ornitina es capaz de inhibir a la ornitina descarboxilasa, enzima clave de la biosíntesis de las poliaminas, con lo cual se tendría un compuesto único, con capacidad para inhibir la biosíntesis de las poliaminas en dos sitios diferentes, y por lo tanto se esperaría una inhibición mayor y un mejor efecto farmacológico.

CONCLUSIONES

Se hizo un estudio comparativo del posible efecto inhibitorio de la δ -N-yodoacetil ornitina, ϵ -N-yodoacetil lisina, δ -N-formil ornitina y ϵ -N-formil lisina sobre la arginasa de hígado de rata.

Se encontró que únicamente la δ -N-formil ornitina inhibió de manera competitiva a la arginasa, con una K_i de 6 mM en tanto que los otros tres compuestos no la inhibieron.

Los resultados mostraron que la distancia entre los dos átomos de nitrógeno es importante, ya que al aumentar un átomo de carbono a la δ -N-formil ornitina, como en la ϵ -N-formil lisina, se perdió la afinidad por el sitio activo y ya no hubo inhibición.

Estos estudios mostraron además, que la arginasa de hígado de rata no presenta tolerancia de grupos químicos voluminosos en las proximidades del grupo δ -amino de la orni-

tina, ya que los derivados yodoacetilados estudiados, con grupos voluminosos en esa posición, no entraron al sitio activo de la enzima, y la δ -N-formil ornitina, con un grupo formilo pequeño sí entró, puesto que compete con el sustrato por el sitio activo de la arginasa, inhibiéndola.

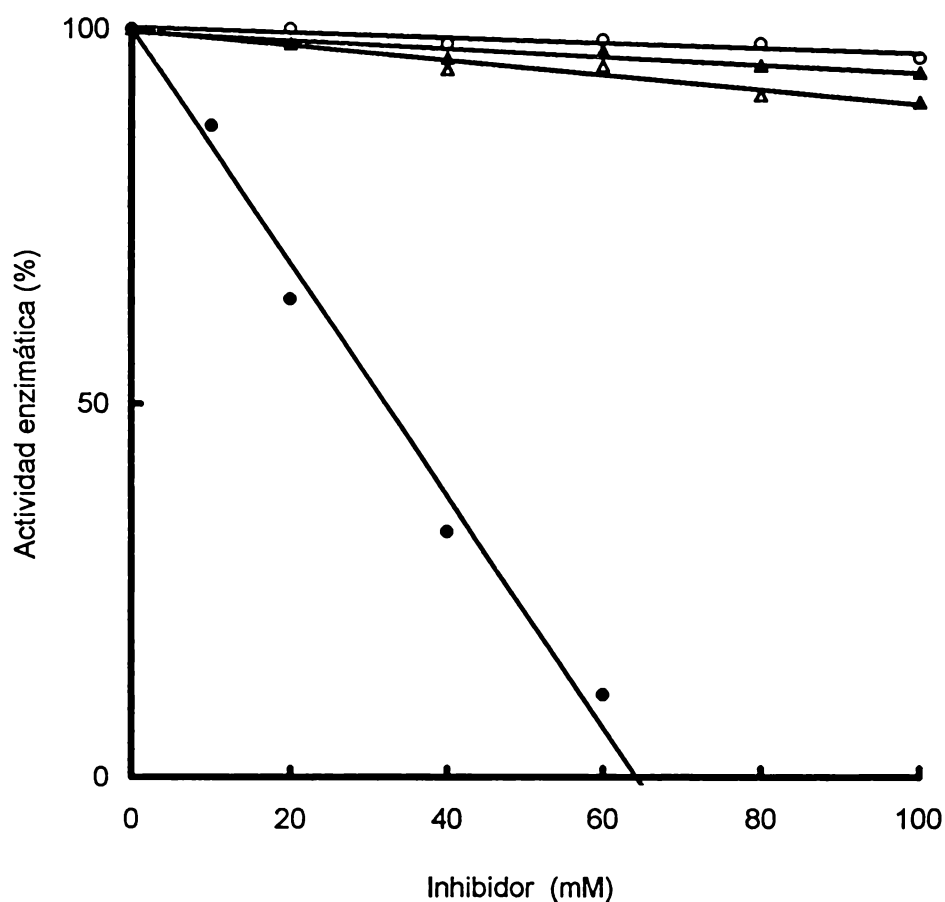


Fig. 1. Efecto de la δ -N-formil ornitina (●), (○), δ -N-yodoacetil ornitina (▲) y ϵ -N-yodoacetil lisina (Δ) sobre la actividad de la arginasa de hígado de rata. La actividad de la arginasa se determinó por el método de Tarrab *et al.* (1974).

SUMMARY

Trying to obtain information regarding arginase active site topology, we performed a comparative study on the possible inhibitory effect of δ -N-iodoacetyl ornithine, δ -N-formyl ornithine, ϵ -N-iodoacetyl lysine and ϵ -N-formyl lysine on rat liver arginase. Among the four studied substances, only the δ -N-formyl ornithine produced a competitive inhibition of rat liver arginase. Our studies suggest that this arginase, does not have tolerance for bulky chemical groups near the ornithine δ -amino group in the enzyme-substrate complex, because the studied iodoacetylated derivatives, with bulky chemical groups in that position, do not enter to the active site of the enzyme whereas the δ -N-formyl ornithine, with a small formyl group, really enters into this active site, because it competes for the arginase active site producing inhibition. The distance between the two amino groups in the inhibitor molecule is also important, because when we increase one carbon atom to the δ -N-formyl ornithine, the affinity for the active site was lost and inhibition was no longer observed.

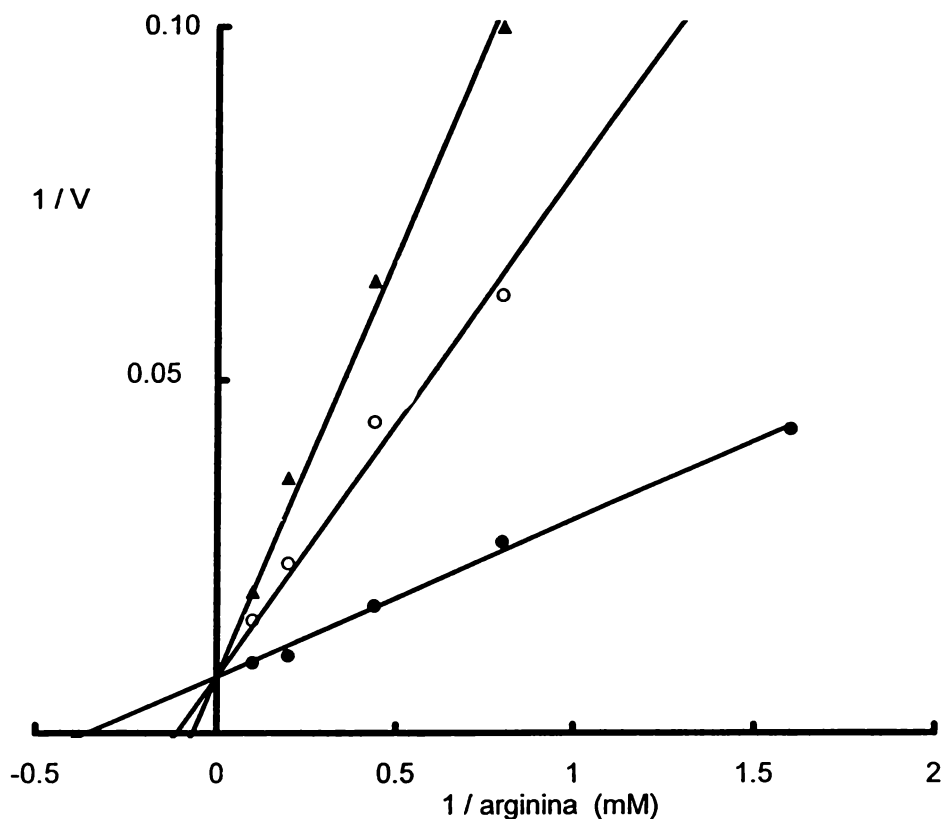


Fig. 2. Determinación del tipo de inhibición que produce la δ -N-formil ornitina sobre la arginasa de hígado de rata (método de Lineweaver-Burk). La actividad de la arginasa se determinó por el método de Tarrab *et al.* (1974). ●, arginasa. ○, arginasa + 20 mM del inhibidor. ▲, arginasa + 40 mM del inhibidor.

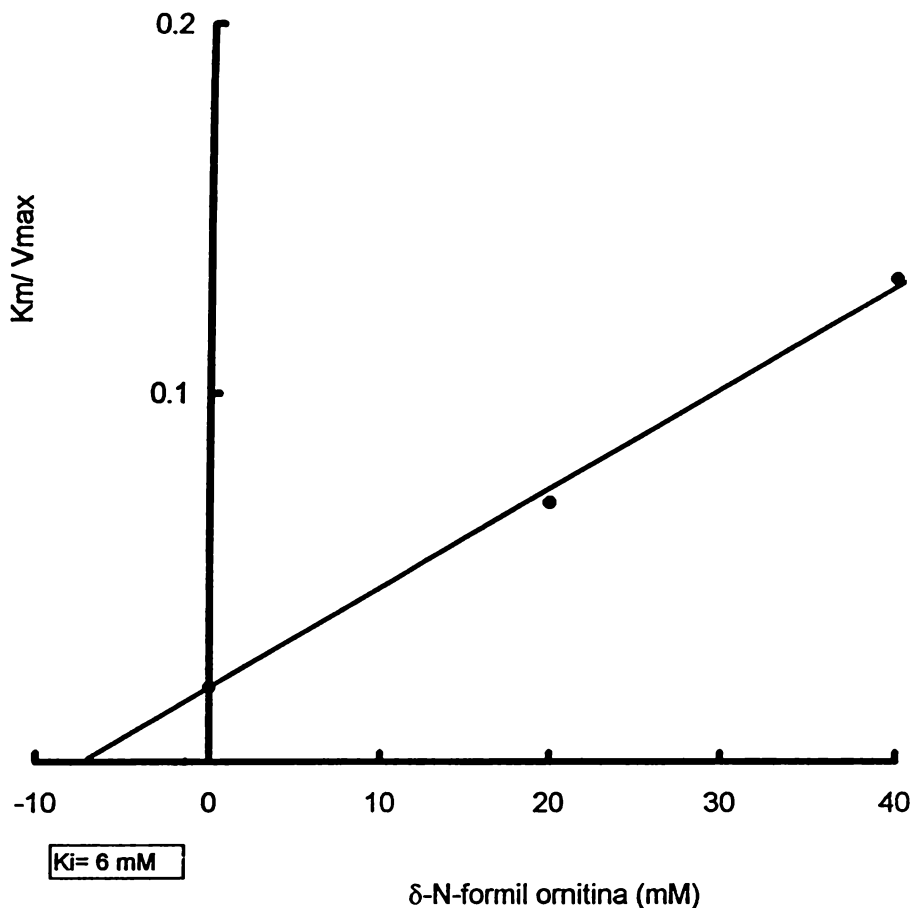


Fig. 3. Determinación de la constante de inhibición (K_i) de la δ -N-formil ornitina para la arginasa de hígado de rata (método de Dixon y Webb, 1979). Los datos se tomaron de la figura 2.

BIBLIOGRAFÍA

- BALASUNDARAM, D. and A.K. TYAGI, 1991. Polyamine-DNA nexus: structural ramifications and biological implications. *Mol. Cell. Biochem.*, **100**: 129-140.
- DIXON, M. and E.C. WEBB, 1979. Enzyme inhibitors and activation. In: *Enzymes*. 3rd. ed. Longman Group Ltd. London. pp. 332-381.
- FUENTES, J.M., M.L. CAMPO and G. SOLER, 1994. Kinetics and inhibition by some aminoacids of lactating rat mammary gland arginase. *Arch. Int. Physiol. Biochem. Biophys.*, **102**: 255-258.
- HE, Y., T. SHIMOGORY, K. KASHIWAGI, A. SHIRAHATA and K. IGARASHI, 1995. Inhibition of cell growth by combination of alpha-difluoromethylornithine and an inhibitor of spermine synthase. *J. Biochem.*, **117**: 824-829.
- HEBY, O., 1981. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation*, **19**: 1-20.

- IRAOLA, J.R.C., 1985. Síntesis de ácido 2-amino-6-yodoacetamido hexanoico, probable inhibidor de la ornitina descarboxilasa. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
- JENKINSON, C.P. and M.R. GRIGOR, 1994. Rat mammary arginase. Isolation and characterization. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **51**:156-165.
- MARTON, L.J. and A.E. PEGG, 1995. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **35**: 55-91.
- MÉNDEZ, J.D., R. YAÑEZ, C. WONG and J.J. HICKS, 1986. Uterine arginase inhibition affect the rat embrionic development. *Contraception*, **33**: 597-604.
- NIKOLIC, J., G. BJELAKOVIC and G. KOCIC, 1993. Effects of folic acid and methotrexate on arginase activity in regenerating rat liver tissue. *Arch. Int. Physiol. Biochem. Biophys.*, **101**: 271-273.
- OKAWA, K. and S. HASE, 1963. The synthesis of N-formyl basic amino acid. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **36**: 754.
- OLIVER, F.O., 1980. Síntesis del ácido 2-amino-5-yodoacetamido valérico, probable inhibidor selectivo e irreversible de la deshidrogenasa láctica. Tesis Profesional. E.N.C.B., IPN.
- OUZOUNIS, C.A. and N.C. KYRPIDES, 1994. On the evolution of arginase and related enzymes. *J. Mol. Evol.*, **39**: 101-104.
- PEGG, A.E., 1988. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as target for chemotherapy. *Cancer Res.*, **48**: 759-774.
- RAHMATULLAH, M. and T.R.C. BOYDE, 1980. Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinisation. *Clin. Chem. Acta*, **107**: 3-9.
- RECZKOWSKY, R.S. and D.E. ASH, 1994. Rat liver arginase: Kinetic mechanism, alternate substrates and inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.*, **312**: 31-37.
- RODRÍGUEZ-PÁEZ, L., 1994. Diseño, síntesis y estudio de inhibidores de la ornitina descarboxilasa. Tesis Doctoral. E.N.C.B., IPN.
- SCHIMKE, R.T., 1964. The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in rat liver. *J. Biol. Chem.*, **239**: 3808-3817.
- SCHUBER, F., 1989. Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem. J.*, **260**: 1-10.
- SEILER, N., 1991. Pharmacological properties of the natural polyamines and their depletion by biosynthesis inhibitors as a therapeutic approach. *Progr. drug Res.*, **37**: 107-159.
- TABOR, C.W. and H. TABOR, 1976. 1,4-diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Ann. Rev. Biochem.*, **45**: 285-306.
- _____, 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.*, **49**: 81-99.
- _____, 1964. Spermidine, spermine and related amines. *Pharmacol. Rev.*, **16**: 245-300.
- TARRAB, R., J. RODRÍGUEZ, C. HUITRON, R. PALACIOS and G. SOBERON, 1974. Molecular forms of rat liver arginase. *Eur. J. Biochem.*, **49**: 457-468.