

Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Xantindeshidrogenasa hepática y sus inhibiciones por fármacos antigotosos

por

A. Marín, J. Martín-Esteve y F. Calvet

(Recibido para publicar el 14 de octubre de 1964)

La colchicina y la fenilbutazona son dos agentes terapéuticos profusamente empleados con gran éxito en el tratamiento de la gota humana, estado patológico que depende de un dismetabolismo purínico caracterizado por una sobreproducción de ácido úrico. A pesar del mucho tiempo transcurrido desde que se hace uso clínico de sus beneficiosas cualidades, se desconocen sus mecanismos de actuación. Considerando la posibilidad de que ejercieran alguna influencia inhibidora sobre las últimas fases del metabolismo formador de úrico, nos propusimos investigar su acción sobre el sistema xantindeshidrogenásico del hígado.

Para nuestro estudio se escogió trabajar *in vitro* con homogenados de hígado de pollo, por el elevado contenido en xantindeshidrogenasa de su parénquima hepático y por la fácil asequibilidad del animal. Además la conocida carencia de uricasa del hígado de ave nos ha permitido establecer las actividades enzimáticas por determinación directa del ácido úrico producido en fun-

ción del tiempo de incubación, para lo que se ha utilizado el método colorimétrico de BROWN (2).

El homogenado hepático de pollo posee una gran capacidad de deshidrogenar la xantina a ácido úrico, si se trabaja en medio aerobio y en presencia de azul de metileno (MB) o de cloruro de trifeniltetrazolium (TTC). En ausencia de colorante, su actividad deshidrogenásica es pequeña (y probablemente ejercida gracias al concurso de transportadores electrónicos naturales, presentes en el homogenado: según MORELL (12), el citocromo C y los sistemas láctico, glutámico y succínico-deshidrogenásicos, en colaboración con el NAD), pero suficiente para que algunos investigadores originalmente hubieran atribuido cierta actividad oxidásica al enzima. Sin embargo, nosotros hemos observado (de acuerdo con MORELL, loc. cit) que una incipiente purificación de la deshidrogenasa proporciona un preparado que es totalmente incapaz de catalizar la oxidación directa de la xantina por el oxígeno molecular.

Si se incuban homogenados en medio estrictamente anaerobio entonces no se observa formación de úrico (la xantindeshidrogenasa prácticamente no actúa), sino que se acumulan ciertas cantidades de hipoxantina y de xantina en el medio (formadas a partir de metabolitos endógenos), que son equivalentes molarmente a las de ácido úrico que se producen cuando se experimenta en condiciones aerobias.

En el presente trabajo se describen algunas características de la xantindeshidrogenasa presente en los homogenados hepáticos y se establece el valor de su constante K_m de Michaelis-Menten; se estudian las potentes inhibiciones ejercidas sobre la actividad enzimática, por los fármacos antigotosos colchicina y fenilbutazona, y se determinan los valores de las correspondientes constantes de inhibición K_i . En un trabajo posterior se describirá la purificación y concentración del enzima, así como la determinación de la K_m y de las K_i con el preparado purificado, cuyos valores, podemos adelantar, son coincidentes con los aquí establecidos con el homogenado (10).

Se sugiere que la acción terapéutica de ambos agentes sobre la gota debe estar relacionada, por lo menos en parte, con sus respectivas acciones inhibitoras de la producción de úrico catalizada por la deshidrogenasa de la xantina.

Material y métodos

Sustratos inhibidores y preparados enzimáticos

Se han utilizado xantina y ácido úrico Merck, e hipoxantina Fluka: las bases se purificaron previamente por recristalización en agua hirviendo. Las disoluciones patrón de hipoxantina y de xantina se prepararon disolviendo cantidades pesadas en pequeños volúmenes de NaOH 0,5 N, calentando suavemente a

baño maría, ajustando al pH conveniente y enrasado al volumen final en matraz aforado. La disolución de ácido úrico se hace en agua hirviendo que contenga la mitad del peso de ácido en carbonato de litio, y enrasando al volumen definitivo.

El azul de metileno y el cloruro de trifeniltetrazolium fueron ambos de procedencia Merck.

La colchicina Houdé, Fluka o Merck, indistintamente, y la fenilbutazona nos fue facilitada por un Laboratorio comercial de Barcelona, pero recristalizada por nosotros, tres veces en alcohol de 70 %. El Antabús (disulfuro de tetractiltiouram) nos fue suministrado por LEFA y sometido dos veces a recristalización en acetona. El clorhidrato de hidroxilamina, el de semicarbazida y el cianuro potásico, fueron adquiridos de marcas de reconocida garantía y de la mejor calidad analítica.

La xantinoxidasa de leche nos fue suministrada por Nutritional Biochemicals Corporation en forma de suspensión en sulfato amónico, y contenía 7,4 U./ml. La uricasa que utilizamos procedente de la misma casa N.B.C. se presenta en forma de un polvo liofilizado de riqueza 4,5 U./gr.

Preparación de homogenados.

Se utilizaron hígados de pollos recién sacrificados, o bien glándulas adquiridas en el mercado y conservadas al estado de congelación; la elevada actividad deshidrogenásica de estas glándulas en presencia de azul de metileno, varía de uno a otro de estos animales, siendo su valor medio del orden de 1.5 μ Mols úrico/min./gr. de hígado, a 25° C., o sea, 1.5 Unidades/gr. de hígado fresco. [Esta actividad es unas 10 veces superior que la del hígado rata, y unas 40 veces mayor que la glándula humana, según propias determinaciones, en curso de publicación (9).]

Los homogenados de hígado se pre-

paran mediante un desintegrador-batidor eléctrico tipo Turmix o Waring Blendor, en el que se introduce una cantidad pesada de la glándula, fresca o congelada, y el volumen requerido de tampón fosfatos 0,05 M de pH 7,4: la relación más frecuentemente utilizada es la de 1:5 peso/volumen. La operación se lleva a cabo enfriando previamente el aparato y las disoluciones tampón, y cuidando que la temperatura de la mezcla se mantenga por debajo de los 8 ó 10° C., durante toda la operación; generalmente basta con hacer funcionar el aparato por tres períodos de 1 minuto cada uno, separados por sendas pausas, también de 1 minuto. Cuando se trata de confeccionar homogenados destinados a la experimentación anaerobia, es imprescindible el operar con un tampón por el que previamente se ha hecho pasar nitrógeno mientras se enfría, a lo largo de un período prolongado de tiempo; y durante el funcionamiento del aparato desintegrador se hace pasar una corriente de nitrógeno, introducida por un tubo abductor que atraviesa la tapadera del aparato.

Los homogenados se conservan mal aun mantenidos en la nevera, y conviene utilizarlos dentro del mismo día en que se han preparado.

Determinación de actividades xantindeshidrogenásicas y de sus inhibiciones

La determinación de actividades xantindeshidrogenásicas de los hígados de pollo se inicia preparando un homogenado del parénquima en tampón fosfato 0,05 M de pH 7,4, de concentración 1:5, el cual se diluye convenientemente con tampón (diluciones de 1:20 hasta 1:500), para conseguir actividades adecuadas (según se adicionen sustratos y colorantes o no) a la determinación del ácido úrico producido en las reacciones.

Las incubaciones se llevan a cabo en matracitos de unos 100 ml. de capacidad, provistos de un tapón esmerilado atra-

vesado por dos tubos para la introducción y salida de oxígeno, aire o nitrógeno, según los casos. El tubito por el que penetra el gas llega hasta el fondo del recipiente, con lo que el burbujeo asegura la agitación y la homogeneidad de la mezcla. Los matracitos se mantienen sumergidos en un termostato regulado a 25° C. durante la incubación.

Para determinar actividades generalmente se mezclan 5 ml. del homogenado diluido, con 5 ml. de xantina 2×10^{-4} M; 0,5 ml. de azul de metileno 0,01 M (o TCC) y 5,5 ml. de tampón fosfatos 0,05 M de pH 7,4, se hace burbujear oxígeno o aire, y se extraen muestras de 3 ml. a los 0, 5, 10, 15 y 20 minutos de incubación. (Cuando se emplean inhibidores éstos se añaden disueltos en un pequeño volumen de agua o de tampón, lo que obliga a hacer un reajuste de la cantidad de tampón empleado, para no alterar el volumen final de la mezcla; y lo mismo hay que tener en cuenta cuando se prescinde del empleo de colorante, o de la adición del sustrato.) Naturalmente, en las incubaciones anaerobias es nitrógeno (en vez de oxígeno) el gas que se hace circular. Las muestras extraídas se vierten sobre sendos 1 ml. de ácido perclórico al 5 % (o de tricloracético), con objeto de detener instantáneamente las acciones enzimáticas. Después de separados por filtración los precipitados producidos en las defecaciones, en los líquidos incoloros recogidos, se determina el ácido úrico por el método colorimétrico de H. BROWN (2). Mediante la curva de tiempos frente a densidades ópticas se calcula gráficamente (tangente en el origen) la velocidad inicial de reacción.

Determinación de hipoxantina, xantina y ácido úrico, por adaptación del método espectrofotométrico diferencial de KALCKAR (5).

En las incubaciones anaerobias, principalmente, o en las aerobias con hipo-

xantina adicionada (sin MB), con objeto de poder conocer las cantidades de hipoxantina, de xantina y de ácido úrico que se acumulan o se transforman, hemos usado una adaptación del método de espectrofotometría diferencial de KALCKAR que permite establecer, separadamente, las cantidades de cada una de las tres purinas presentes en una mezcla.

El método se basa en un empleo adecuado de la xantinoxidasa de la leche y de la uricasa, y en medir los cambios de densidad óptica, a determinadas longitudes de onda, que tienen lugar cuando dichos enzimas actúan oxidando a la hipoxantina, a la xantina o al ácido úrico, presentes en el líquido problema.

Previamente hay que proceder a situar la posición de los máximos de absorción de cada una de las tres purinas, independientemente, así como a establecer sus respectivos coeficientes de absorción específica; para estas determinaciones se trabajó exactamente a pH 7,5, porque únicamente así se consigue que los dos puntos isobésticos, A y B, estén en sensible coincidencia con las longitudes de onda de máxima absorción de la hipoxantina y de la xantina, respectivamente (véase fig. 1).

Purina	Máximo	$\epsilon = \frac{1}{C_{\text{molar}} L_{\text{cm}}} \text{D.O.}$
Hipoxantina	248 m μ	$10,5 \times 10^3$
Xantina	270 m μ	$8,7 \times 10^3$
Acido úrico	290 m μ	$12,4 \times 10^3$

Observando la figura 1 se comprende cómo operando a la longitud de onda correspondiente al punto A (248 m μ), en el que la xantina y el ácido úrico poseen idénticos coeficientes de extinción, se puede establecer la cantidad de hipoxantina presente en una disolución, midiendo la diferencia de densidad óptica del líquido problema, antes y después de ha-

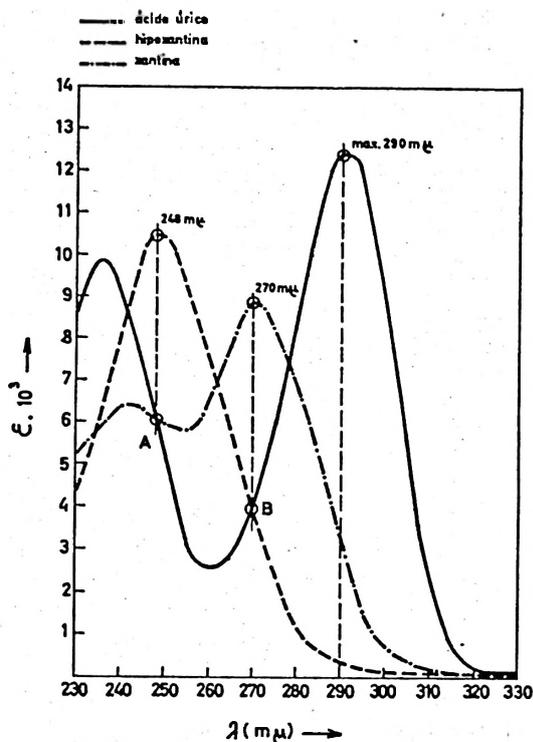


FIG. 1. Curvas de absorción de las purinas a pH 7,5.

ber dejado actuar a la xantinoxidasa en cantidad y tiempo suficientes para provocar la desaparición total de la base. Análogamente, trabajando a la longitud de onda del punto B (270 m μ), en el cual la hipoxantina y el úrico poseen coincidentes coeficientes de extinción, se consigue determinar la cantidad de xantina presente por diferencia, por el cambio de densidad óptica del líquido, experimentado por la actuación de la oxidasa.

En experimento aparte, se deja actuar a la uricasa a pH 8,5, y se mide la diferencia de densidad óptica a 290 m μ , antes y después de la actuación enzimática, lo que constituye una medida del ácido úrico presente.

La cantidad de úrico formada por la acción de la xantinoxidasa debe corresponder equimolecularmente a la suma de

las cantidades de hipoxantina y de xantina, originalmente presentes, lo que constituye una comprobación de la bondad del método analítico.

1. DETERMINACIÓN DE XANTINA Y DE HIPOXANTINA (mediante xantinoxidasa).

Se toma un volumen de líquido problema, previamente defecado por adición de ácido perclórico hasta una concentración del 1 %, se lleva a pH 7,5 por adición cuidadosa de NaOH 0,5 N, y se hace una dilución conveniente con tampón fosfatos 0,05 M de pH 7,5.

En una cubeta del espectrofotómetro se introducen 2,5 ml. de tampón y 0,5 ml. de una disolución enzimática de xantinoxidasa N.B.C. diluida de 50 a 100 veces, y se ajusta el aparato al valor 0 de densidad óptica. En otra cubeta análoga se colocan, por este orden, 2 ml. del problema diluido, 0,5 ml. de tampón y 0,5 ml. de la disolución enzimática, se agita rápidamente la mezcla, e inmediatamente se efectúan lecturas de densidad óptica (frente a la otra cubeta como referencia) fijando los tiempos de las lecturas mediante un cronómetro: las primeras lecturas se practican distanciadas entre sí por pocos segundos, pero luego se van espaciando más, y se prosiguen hasta que ya no haya ulterior variación de densidad óptica, lo que suele ocurrir entre los 30 y los 60 minutos. Esta operación se repite, independientemente, a cada una de las siguientes longitudes de onda: 248, 270 y 290 m μ (correspondientes a hipoxantina, xantina y ácido úrico).

Se trazan las curvas respectivas (densidades ópticas frente a tiempos) y se determinan gráficamente las densidades ópticas de los líquidos a tiempos 0, por extrapolación. Las variaciones totales de densidades ópticas observadas (diferencias entre tiempos 0 y finales) permiten, con auxilio de los coeficientes de extinción molares antes indicados, establecer

las concentraciones originales de las dos bases, y el ácido úrico total producido en la degradación de las mismas.

2. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO (mediante uricasa).

El líquido problema defecado con perclórico se ajusta a pH 8,5 mediante NaOH 0,5 N, y se diluye adecuadamente con tampón borato 0,1 M de pH 8,5.

Se trabaja en el espectrofotómetro con dos cubetas (de manera análoga a la descrita en la determinación anterior) y se emplea una dilución del enzima uricasa N.B.C. que contenga de 1 a 2 mg./ml. La variación de densidad óptica (diferencia entre el valor extrapolado a tiempo 0 y el hallado al tiempo final), con auxilio del valor del coeficiente de extinción molar, conduce a establecer la cantidad de úrico presente en el líquido investigado.

Investigación cromatográfica de las bases purínicas presentes en los homogenizados.

Para esta investigación se utilizó la cromatografía de papel ascendente empleando papel cromatográfico Whatman n.º 1. Como disolventes para el desarrollo de los cromatogramas nos produjeron buenos resultados las siguientes mezclas: n-butanol-agua (172 ml. butanol y 28 ml. agua) y metanol-fórmico-agua (160 ml. metanol, 30 ml. ácido fórmico de 90 %, y 10 ml. de agua). Se investigaron las cuatro bases adenina, guanina, hipoxantina y xantina, para lo que se prepararon sendas disoluciones patrón de las mismas, con cuyos R_f respectivos se compararon las manchas obtenidas con los líquidos problema. El revelado de los cromatogramas se practicó sumergiéndolos en un reactivo constituido por una mezcla de volúmenes iguales de una disolución acetónica de azul de bromofenol al 0,4 % y otra acuosa de nitrato

argéntico al 2 %; después de mantenido el papel al aire unos 10 minutos, se lava varias veces con agua destilada y finalmente se seca al aire.

Los líquidos problema a cromatografiar (esto es, los homogenados antes y después de su incubación), una vez defecados con ácido perclórico, deben previamente someterse a un proceso de eliminación de las sales inorgánicas que contienen (porque interfieren con el buen desarrollo del cromatograma) por el siguiente procedimiento: se neutralizan con KOH 0,1 N, y se dejan reposar unas horas, con lo que cristaliza perclorato potásico; los líquidos filtrados se desecan a vacío a la temperatura ambiente, en un desecador que contenga P_2O_5 . Los residuos secos se extraen con piridina (que deja insolubles a las sales) y la disolución se evapora a sequedad en vacío. Con el residuo se repite la extracción piridínica, y así se obtiene una disolución prácticamente exenta de sales, utilizable directamente para situar las manchas de partida en el papel cromatográfico.

Resultados y discusión

Observaciones sobre las incubaciones anaerobia y aerobia de un homogenado hepático.

Cuando se incuba un homogenado de hígado de pollo, en medio aerobio, se observa con el tiempo, una definida producción de ácido úrico, a costa de la xantina presente en el homogenado, y de las nuevas cantidades de base formadas durante la incubación. La xantindeshidrogenasa presente, probablemente, actúa en colaboración con los transportadores electrónicos naturales de las células hepáticas (12), provocando la deshidrogenación de la xantina. La producción de úrico es limitada y, desde luego, menor que cuando se adiciona xantina

al homogenado y, sobre todo, si se trabaja en presencia de azul de metileno (véase más adelante).

Pero si la incubación se efectúa en medio anaerobio, es decir, haciendo pasar nitrógeno por un homogenado que se ha preparado trabajando en atmósfera inerte, entonces la xantindeshidrogenasa no actúa produciendo úrico y, en cambio, se observa una cierta acumulación de hipoxantina y de xantina en el incubado, que va acompañada de la desaparición de la adenina y de la guanina originalmente presentes, según se ha podido comprobar cualitativamente mediante cromatografía de papel, utilizando la técnica antes descrita. Las cantidades de hipoxantina, más la de xantina presentes después de la incubación, corresponden equimolecularmente a la de úrico que se produce cuando la incubación se practica haciendo burbujear oxígeno o aire por la mezcla. Estas observaciones están de acuerdo con la concepción admitida de que en el catabolismo purínico, la adenina y la guanina transforman a la adenina y a la guanina en hipoxantina y xantina, por desaminación oxidativa, y estas últimas bases, cuando la aerobiosis es suficiente, son definitivamente transformadas por la xantindeshidrogenasa en ácido úrico.

Estas degradaciones se han podido seguir cuantitativamente empleando una adaptación del método espectrofotométrico diferencial de KALCKAR antes referido (5), que permite determinar las cantidades de hipoxantina, xantina y ácido úrico presentes en mezclas heterogéneas (Tablas I y II).

Por otra parte, se ha observado que la incubación aerobia durante 2 horas de un homogenado hepático adicionado de hipoxantina, pero sin azul de metileno, apenas provoca incremento alguno de su producción normal de ácido úrico, mientras que se forman cantidades substanciales de xantina, a costa de la hipoxantina que desaparece; es preciso adicionar

TABLA I

Resultados comparativos obtenidos en la incubación aerobia de un homogenado hepático de pollo durante 2 horas, sin y con xantina adicionada, en ausencia o presencia de azul de metileno (MB).

Concentración del homogenado: 62,5 mg hígado/ml

Ensayo	Hipoxantina μ Mols/gr hígado			Xantina μ Mols/gr hígado			Acido úrico μ Mols/gr hígado		
	Tiempo 0	2 Horas	Δ	Tiempo 0	2 Horas	Δ	Tiempo 0	2 Horas	Δ
Sin Xantina Sin MB	0.2	0.0	-0.2	0.3	0.0	-0.3	2.2	8.3	6.1
Sin Xantina Con MB 6.25×10^{-4} M	0.2	0.0	-0.2	0.3	0.0	-0.3	2.2	8.8	6.6
Con Xantina 10μ Mols/gr. hígado Sin MB	0.3	0.0	-0.3	10.2	3.5	-6.7	2.7	15.9	13.2
Con Xantina 10μ Mols/gr. hígado Con MB 6.25×10^{-4} M	0.3	0.0	-0.3	10.2	0.0	-10.2	2.6	19.5	16.7*

* Obsérvese que esta cifra no puede ser mayor que la hallada, porque en esta muestra incubada, todo el sustrato adicionado resulta consumido; en otros ensayos aparte, a los que se incorporaron cantidades superiores de xantina (50μ Mols/gr. hígado) la cantidad de úrico producida fue mucho mayor, sobre todo en comparación con la cifra de ácido que se forma en ausencia de MB (la cual permanece más o menos coincidente con la consignada en la Tabla).

azul de metileno o cloruro de trifenilte-trazolium al medio, para conseguir, entonces, que toda la xantina recién formada y la hipoxantina no metabolizada, se transformen cuantitativamente en ácido úrico. Esta conversión total de la hipoxantina en úrico vía xantina se observa también cuando la incubación del homogenado, sin azul de metileno, se prolonga por más tiempo, 4 ó 5 horas. Parece, por lo tanto, que el homogenado posee insuficientes cantidades de transportadores electrónicos para conseguir que la transformación final de toda la hipoxantina adicionada en úrico, tenga lugar en un limitado período de tiempo (Tabla III).

Actividades xantindeshidrogenásicas de los hígados de pollo.

Para determinar estas actividades se procede, como antes se ha descrito, preparando un homogenado diluido, de 1:200 a 1:500, e incubándolo a 25° C. junto con xantina añadida, en presencia de azul de metileno y en corriente de aire o de oxígeno. Las cantidades de úrico producidas en tiempos preestablecidos se determinan por medición de las densidades ópticas de las coloraciones obtenidas con el reactivo fosfotungstico de BROWN (2), y con el auxilio de una curva de calibrado de ácido úrico, según

TABLA II

Resultados comparativos obtenidos en las incubaciones de un homogenado hepático en medios anaerobio y aerobio, respectivamente (sin adición alguna de sustrato o de colorante).

Concentración del homogenado: 62,5 mg hígado/ml

Ensayo	Hipoxantina $\mu\text{Mols/gr hígado}$	Xantina $\mu\text{Mols/gr hígado}$	Acido úrico $\mu\text{Mols/gr hígado}$
Tiempo 0	0.1	3.5	2.1
Incubación anaerobia 2 horas	2.4	0.3	2.2
Incubación aerobia 2 horas	0.0	0.0	8.5

se ha descrito previamente. Se construye la curva de úrico producido frente a tiempos de incubación, y se deduce gráficamente la velocidad inicial de la reacción.

Como promedio de los valores obtenidos operando con 10 animales distintos, trabajando en presencia de MB, se obtuvo que se producen $1,5 \pm 0,3 \mu\text{Mols}$ úrico/minuto/gr. de hígado fresco, o sea que la actividad media de los hígados de pollo es del orden de 1,5 Unidades/gr. de hígado. (Según propias determinacio-

nes la actividad xantindeshidrogenásica del hígado de rata es 0,15 U./gr. aproximadamente, la del cerdo es del orden de 0,03 U./gr. y la humana, 0,04 U./gr. [véase 10].)

El significado biológico de la elevada actividad xantindeshidrogenásica poseída por el hígado de pollo (en comparación con los mamíferos) hay que buscarlo en el metabolismo uricotélico típico de las aves, que en estos animales representa la senda principal de la degradación de sus proteínas.

TABLA III.

Resultados comparativos obtenidos en la incubación aerobia de un homogenado hepático con hipoxantina adicionada; en ausencia o presencia de azul de metileno ($6,25 \times 10^{-4} M$).

Tiempo de incubación, 2 horas.

Concentración del homogenado 62,5 mg/ml. Cantidad de hipoxantina adicionada: 10 $\mu\text{Mols/gr hígado}$.

Ensayo	Hipoxantina $\mu\text{Mols/gr hígado}$			Xantina $\mu\text{Mols/gr hígado}$			Acido úrico $\mu\text{Mols/gr hígado}$		
	Tiempo 0	2 horas	Δ	Tiempo 0	2 horas	Δ	Tiempo 0	2 horas	Δ
Sin MB	11.1	4.3	-6.8	0.3	6.4	6.1	2.1	9.6	7.5
Con MB	11.1	0.0	-11.1	0.3	0.0	-0.3	2.2	19.9	17.7

Influencias de la hidroxilamina, de la semicarbazida y del Antabús, sobre la acción xantindeshidrogenásica hepática del pollo.

El enzima presente en el hígado de pollo que cataliza la oxidación de la xantina a ácido úrico es, en nuestra opinión (y de acuerdo con RICHERT y WESTERFELD [13]), una deshidrogenasa típica. La pequeña actividad «seudoxidásica», exhibida por los homogenados en ausencia de MB, la cual se pierde en cuanto el enzima se purifica incipientemente, ha sido la causa de que anteriormente se le atribuyera carácter de oxidasa. Nosotros pensamos que la actividad «seudoxidásica» exhibida por los homogenados hepáticos crudos, en realidad es una acción de deshidrogenasa realizada con el concurso de los transportadores electrónicos naturales presentes en las células hepáticas originales.

Para caracterizar a la deshidrogenasa que nos ocupa y comparar sus propiedades con el enzima del hígado de mamífero y con la xantinoxidasa de la leche, hemos ensayado las influencias de tres de los productos estudiados por WESTERFELD y col. (14), a saber, los reactivos del grupo carbonilo, la hidroxilamina y la semicarbazida, y el Antabús (disulfuro de tetractiltiouran). Operando en condiciones parecidas a las descritas por dicho autor, hemos hallado que concentraciones de hidroxilamina del orden de 10^{-2} M provocan inhibiciones del 50 %, aproximadamente, de ambas acciones seudoxidásica (sin MB) y deshidrogenásica, de los homogenados hepáticos diluidos: concentraciones 10^{-2} M de semicarbazida no ejercen acción alguna en presencia de MB, y provocan tan sólo una muy débil inhibición de la actividad seudoxidásica; y el Antabús no inhibe ninguna de ambas actividades.

La xantindeshidrogenasa de hígado de pollo no hay duda de que difiere esencialmente de la xantinoxidasa de la le-

che, pero no se puede decir otro tanto, con certitud, respecto a las deshidrogenasas de la xantina presentes en los hígados de mamífero (las cuales, como es sabido, se caracterizan por poseer una cierta capacidad oxidásica): precisamente, la identidad de los valores de las sendas constantes de Michaelis-Menten halladas por nosotros para el enzima del pollo, y para el de hígado humano, así como los valores de las constantes de inhibición de la colchicina y de la fenilbutazona sobre ambos enzimas, constituyen argumentos experimentales en favor, por lo menos, de la analogía de centros de actividad de ambas xantindeshidrogenasas (trabajo en vías de publicación [9]).

Constante de Michaelis-Menten (K_m) de la xantindeshidrogenasa hepática de pollo.

La única diferencia observada entre las acciones «seudoxidásica» (sin colorante adicionado) y la deshidrogenásica (en presencia de MB) de la xantina, exhibidas por los homogenados hepáticos, consiste en la distinta magnitud de las respectivas velocidades de reacción, la cual es mucho mayor (como ya se ha dicho) en presencia del colorante. Nosotros hemos determinado los valores de las K_m correspondientes a ambas acciones, y habiendo obtenido valores sensiblemente concordantes, suponemos que en ambos casos, se trata de una misma actividad deshidrogenásica: en el primero, el enzima actuaría con el concurso de las limitadas cantidades de transportadores electrónicos naturales (12), mientras que en el segundo, lo hace mucho más eficazmente gracias al MB añadido; también los valores de las constantes de inhibición K_i correspondientes a la colchicina y a la fenilbutazona resultan ser idénticas, tanto si las mediciones se llevan a cabo con o sin la presencia de MB (véase más adelante). Estos hechos están

asimismo en favor de la consideración de que ambas acciones son deshidrogenásicas y catalizadas por un mismo y único enzima.

Para realizar las determinaciones se midieron las velocidades de reacción iniciales, empleando 5 ó 6 concentraciones distintas del sustrato xantina, comprendidas entre $0,25$ y $4,0 \times 10^{-5}$ M, y utilizando el método gráfico de establecimiento de las pendientes en el origen de las curvas de actividad, trazadas éstas con los incrementos de densidad óptica frente a los tiempos de incubación de 2, 4, 6 y 8 minutos. Se trabajó a 25° C. con homogenados diluidos convenientemente, de suerte que en las determinaciones sin colorante las mezclas en incubación contuvieran unos 50 mg. hígado/ml., y en los ensayos con MB la concentración fuera de 2 mg. hígado/ml.

Los valores medios de 5 determinaciones distintas, efectuados con homogenados hepáticos de diferentes pollos, proporcionaron cifras de $K_m = 3,0 \times 10^{-5}$ M para la acción seudoxidásica, y el de $K_m = 2,7 \times 10^{-5}$ M para la acción deshidrogenásica (con MB). Estos dos valores parecen ser lo suficientemente aproximados para permitir sugerir que en ambos casos se trata de las actividades de una misma xantindeshidrogenasa que funciona, en cada una de ambas circunstancias, en colaboración con transportadores electrónicos de distinta eficacia.

Acciones inhibitorias de la colchicina y de la fenilbutazona.

Las constantes de inhibición K_i de estos dos fármacos, al actuar sobre la capacidad xantindeshidrogenásica del homogenado, con y sin MB adicionado, son tan parecidas entre sí que también contribuyen a soportar la idea de que en todos los casos se trata de la actividad de un mismo y único enzima.

Las inhibiciones estudiadas tienen carácter competitivo como se pone de ma-

nifiesto en el estudio cinético que se expresa gráficamente a continuación (figura 2).

Todas las determinaciones se efectuaron a 25° C., y las concentraciones adecuadas de homogenado y de inhibidor

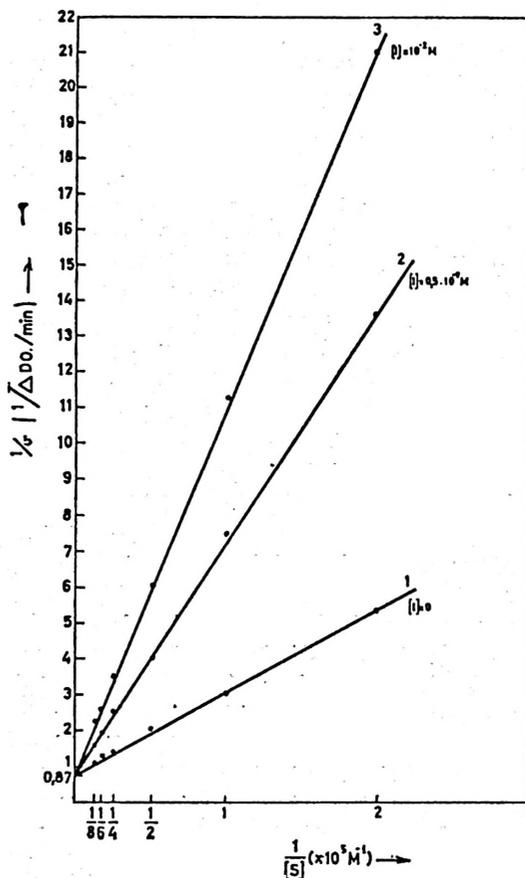


FIG. 2. Determinaciones de la K_i de la inhibición competitiva de la colchicina sobre la acción seudoxidásica de la xantina, ejercida por los homogenados hepáticos de pollo.

$$V_{\max.} = 1,15, \Delta \text{ D.O./min.}$$

$$K_m = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M.}$$

Pendiente de las rectas de inhibición:

$$\frac{K_m}{V_{\max.}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

$$\text{Recta (1): } K_i = 2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$\text{Recta (2): } K_i = 2,7 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$\text{Valor medio: } K_i = 2,6 \times 10^{-3} \text{ M}$$

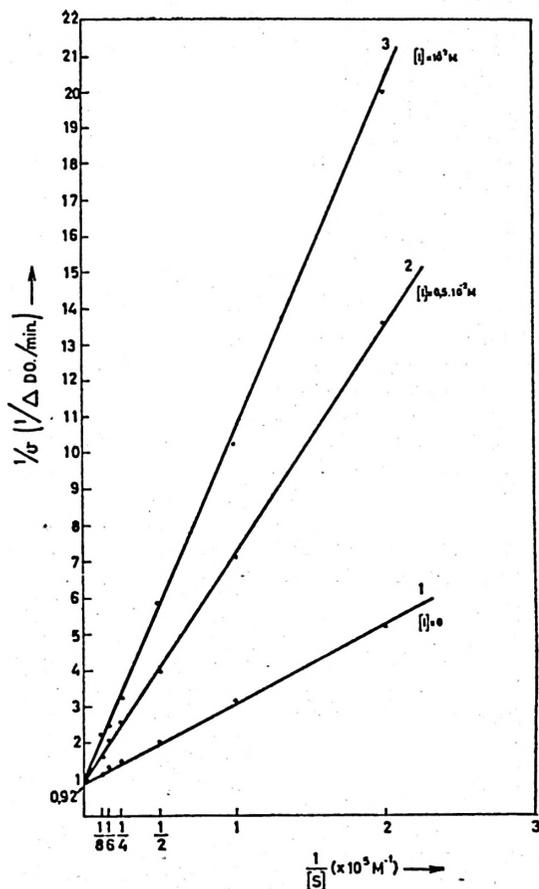


FIG. 3. Determinación de la K_i de la colchicina sobre la acción xantindeshidrogenásica de los homogenados (con MB).

$V_{max} = 1,09, \Delta D.O./min.$
 $K_m = 2,4 \times 10^{-5} M.$
 Recta (1): $K_i = 2,7 \times 10^{-3} M$
 Recta (2): $K_i = 3,0 \times 10^{-3} M$
 Valor medio: $K_i = 2,85 \times 10^{-3} M.$

Nota: Obsérvese cómo este valor de K_i obtenido en presencia de MB es sensiblemente igual al resultado sin la adición de colorante (experimento y Gráfica anteriores).

utilizadas, se escogieron como resultado de ensayos previos de orientación.

La potente acción inhibitoria que ejerce la colchicina sobre la xantindeshidrogenasa hepática del pollo (y también del hombre y de varios animales [9]), junto con los hechos previamente conocidos de

su poder inhibitor de desoxirribonucleasas, y de la desfosforilación y desaminación de desoxirribonucleótidos observados por EBNER y STRECKER (3), así como la activación *in vivo* de la fosfatasa alcalina inespecífica del hígado de rata (descrita por los mismos autores), la inhibición de la nucleotidasa del suero humano, según KEESER (6), y de desoxinucleotidasas por LANG, SIEBERT y OSWALD (7) y por GREENSTEIN et al. (4), la inhibición de la úricorribosidofosforilasa de LASTER y BLAIR (8), y la inhibición de la fagocitosis de cristales de ácido úrico y de la producción de ácido láctico por parte de los leucocitos *in vitro*, MCCARTY (11), constituyen interesantes resultados experimentales en los que, tal vez, pueda basarse, junto con otros hechos futuros,

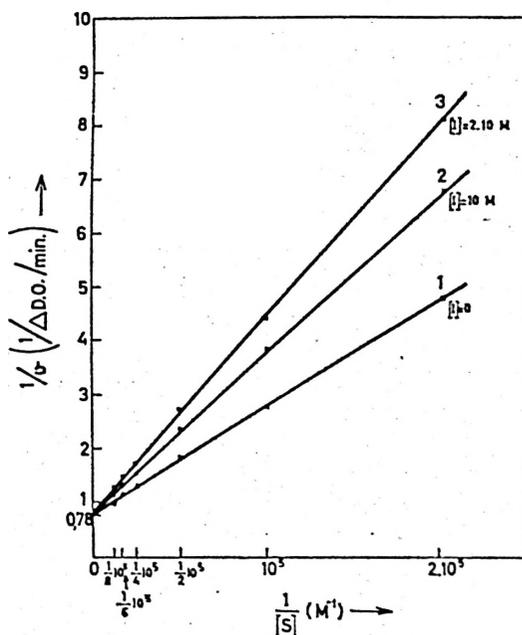


FIG. 4. Determinación de la K_i en la inhibición competitiva de la fenibutazona sobre la acción pseudoxidásica de la xantina ejercida por los homogenados hepáticos de pollo.

$V_{max} = 1,28, \Delta D.O./min.$
 $K_m = 2,6 \times 10^{-5} M.$
 Recta (1): $K_i = 2,0 \times 10^{-2} M$
 Recta (2): $K_i = 2,4 \times 10^{-2} M$
 Valor medio: $K_i = 2,2 \times 10^{-2} M.$

un intento de interpretación de la excelente acción terapéutica del alcaloide en las afecciones gotosas, que son consecuencia de una sobreproducción patológica de ácido úrico.

En relación con la acción inhibitoria del otro fármaco antirreumático, la fenilbutazona, únicamente hemos encontrado descrita en la bibliografía la inhi-

bición que el medicamento ejerce, «in vitro» e «in vivo», según BOSTROM, BERNSTEN y WHITEHOUSE (1), sobre la biosíntesis de sulfatos de mucopolisacáridos por parte del cartilago costal de rata y de otros tejidos conectivos.

Resumen

El presente trabajo sobre la xantindeshidrogenasa hepática se ha realizado «in vitro» trabajando con homogenados de hígado de pollo. La incubación anaerobia de homogenados de hígado transforma a las bases adenina y guanina, en las correspondientes hipoxantina y xantina, sin que haya formación de ácido úrico. Cuando la incubación se lleva en condiciones aerobias, la xantindeshidrogenasa forma una cantidad de ácido úrico, molarmente equivalente a la suma de la hipoxantina y la xantina originalmente presentes en el homogenado. La incubación aerobia de un homogenado, en presencia de xantina adicionada como sustrato, provoca sólo un ligero aumento de la producción normal de ácido úrico: sin embargo, si previamente se adiciona azul de metileno, se produce ácido úrico en elevada cantidad. La adición de hipoxantina en un ensayo similar al anterior se traduce en la formación de xantina como único producto de la reacción; sin embargo, en presencia de azul de metileno dicha base se transforma cuantitativamente en ácido úrico.

La xantindeshidrogenasa de hígado de pollo difiere de la humana y de la procedente de mamíferos en que carece de verdadera actividad oxidásica. La ligera actividad «pseudo-oxidásica» que exhiben los homogenados crudos desaparece mediante una incipiente concentración y purificación del enzima. Los valores de K_m son prácticamente iguales (2,7 — 3,0 · 10⁻³ M), tanto si se establecen en presencia o en ausencia del azul de metileno, lo que parece sugerir que el mismo enzima es el responsable de ambas actividades (pseudo-oxidásica y xantindeshidrogenásica).

La hidroxilamina 10⁻² M inhibe fuertemente al enzima, mientras que tanto la semicarbazida como el Antabús no interfieren con su actividad.

La colchicina y la fenilbutazona, dos drogas ampliamente usadas para el tratamiento de la gota, son potentes inhibidores competitivos

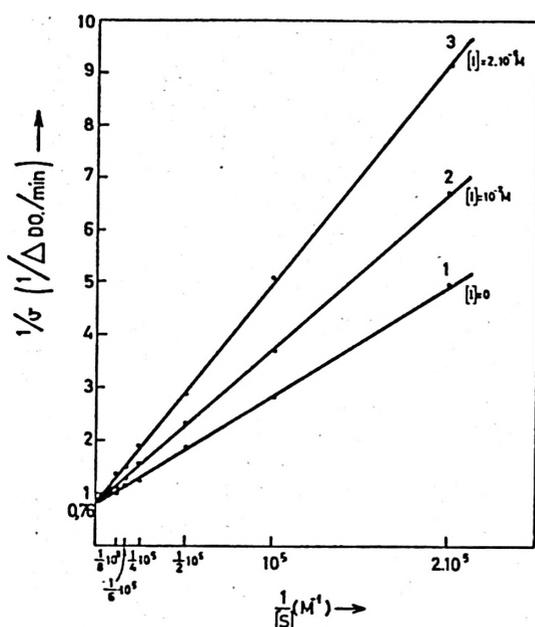


FIG. 5. Determinación de la K_i de la fenilbutazona sobre la acción xantindeshidrogenásica de los homogenados hepáticos de pollo (con MB).

$$V_{max.} = 1,31, \Delta \text{ D.O./min.}$$

$$K_i = 2,7 \times 10^{-3} \text{ M.}$$

$$\text{Recta (1): } K_i = 2,3 \times 10^{-2} \text{ M}$$

$$\text{Recta (2): } K_i = 1,9 \times 10^{-2} \text{ M}$$

$$\text{Valor medio: } K_i = 2,1 \times 10^{-2} \text{ M.}$$

Este valor de K_i obtenido trabajando en presencia de MB (acción deshidrogenásica) para la fenilbutazona, resulta ser de la misma magnitud que el obtenido para la acción pseudoxidásica. Este hecho y el análogo observado con la colchicina, están en favor de que la acción pseudoxidásica y la xantindeshidrogenásica del homogenado de pollo, son acciones similares (deshidrogenásicas), aunque ejercidas con el concurso de transportadores electrónicos de distinta eficacia.

de la xantindeshidrogenasa de pollo (y humana). Las correspondientes constantes de inhibición son: K_i (colchicina) = $2,85 \cdot 10^{-3}$ M; K_i (fenilbutazona) = $2,1 \cdot 10^{-2}$ M.

Se admite generalmente que la gota se caracteriza por un dismetabolismo purínico que provoca una superproducción de ácido úrico. El mecanismo por el que transcurre la acción terapéutica de la colchicina y de la fenilbutazona es desconocido. Pero el hecho experimental de la inhibición «in vitro» de la xantindeshidrogenasa sugiere que dichas drogas puedan contribuir a regular la producción enzimática de ácido úrico «in vivo».

Summary

Hepatic Xantin Dehydrogenase and its Inhibitions by Antigout Drugs

The present study on hepatic xantin dehydrogenase was carried out «in vitro» with chicken liver homogenates. The selection of this animal species for our work was made on account, primarily, of the high enzymatic concentration of the bird's liver (about 1.5 ± 0.3 Units/gr. of tissue, a value established in the presence of methylene blue); moreover, as uricase is not present in the hepatic parenchyma of birds, xantin dehydrogenase activity can easily be established by a direct, colorimetric estimation of the amount of uric acid formed (Brown's method) during incubation of the homogenates.

The results of several incubation experiments, performed both under aerobic and anaerobic conditions, analytically established by paper chromatography and also by an adaptation of Kalckar's differential UV spectrophotometric method, can be summarized as follows: 1) anaerobic incubation of liver homogenates induces the transformation of the bases adenine and guanine present, into the corresponding hipoxantine and xantine, but uric acid is not formed; 2) when the incubation is carried out in aerobic conditions xantin dehydrogenase then indu-

ces the production of a quantity of uric acid molarly corresponding to the sum of hipoxantine plus xantine, which would otherwise accumulate in an anaerobic experiment; 3) if xantine, as a substrate is added to an aerobic incubation of an homogenate, only a slight increase in its normal uric acid production is observed: however, when methylene blue has also previously been added to the mixture, uric acid is then produced in substantial quantities, the dye acting as an effective electron carrier which permits the enzyme to develop its full dehydrogenasic activity; 4) added hipoxantine also acts as a substrate of xantin dehydrogenase, the base being converted into xantine in aerobic conditions, and quantitatively into uric acid when methylene blue is also present.

Chicken liver xantin dehydrogenase differs from that of mammals, and from human liver xantin dehydrogenase, in that it lacks any true oxydasic activity: the slight «pseudoxydasic» activity shown by crude chicken liver homogenates (which contain natural electron carriers) is easily lost when the enzyme is submitted even to a slight purification (ammonium sulphate fractional precipitation). 10^{-2} M Hydroxylamine strongly inhibits the chicken enzyme, whereas semicarbazide and Antabus show practically no action on this xantin dehydrogenase. The value of the Michaelis-Menten constant is practically of the same order $K_m = 2.7 - 3.0 \times 10^{-5}$ M, whether established in the presence or in the absence of methylene blue, either with the crude homogenate or with the partially purified dehydrogenase; these experimental results appear to suggest that the same enzyme is responsible for both the «pseudoxydasic» and the true xantin dehydrogenasic activities shown by liver homogenates.

Colchicine and phenylbutazone, two widely used drugs for the treatment of

human gout, prove potent inhibitors of chicken (and human) liver xantin dehydrogenase. The corresponding inhibition constants have been duly established: K_1 (Colchicine) = 2.85×10^{-3} M; K_1 (Phenylbutazone) = $2,1 \times 10^{-2}$ M.

Although it is generally admitted that gout is a condition due to a certain purin dismetabolism leading to an overproduction of uric acid, nothing is known about the mechanism of the therapeutical action of either drug: the fact that they inhibit liver xantin dehydrogenase «in vitro», seems to suggest that when administered to gouty patients, might contribute to regulate (control) the enzymatic production of uric acid.

Bibliografía

- (1) H. BOSTROM, K. BERNTSEN & M. W. WHITEHOUSE: *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 413, 1964.
- (2) H. BROWN: *J. Biol. Chem.*, **158**, 601, 1945.
- (3) H. EBNER & H. STRECKER: *Experientia*, **6**, 338, 1950.
- (4) J. P. GREENSTEIN, C. E. CARTER & H. W. CHALKLEY: *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, **12**, 64, 1947.
- (5) H. M. KALCKAR: *J. Biol. Chem.*, **167**, 429, 445, 1947.
- (6) E. KEESER: *Arch. exptl. Path. Pharmacol.*, **197**, 187-92, 1941.
- (7) K. LANG, G. SIEBERT & H. OSWALD: *Experientia*, **5**, 449, 1949.
- (8) L. LASTER & A. E. BLAIR: *Fed. Proc.*, **17**, 261, 1958.
- (9) J. MARTÍN-ESTEVE, J. BOZAL y F. CALVET: *Archiv. Interamer. Reumatol.* (en prensa).
- (10) J. MARTÍN-ESTEVE, J. BOZAL y F. CALVET: próxima publicación.
- (11) D. J. McCARTY: *Geriatrics*, **463**, 1963; R. R. HOWELL & J. E. SEGMUELLER: *Arthr. & Rheum.*, **5**, 303, 1962.
- (12) D. B. MORELL: *Biochim. et Biophys. Acta*, **16**, 258, 1955.
- (13) D. A. REICHERT, W. W. WESTERFELD: *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, **76**, 252, 1951.
- (14) W. W. WESTERFELD, D. A. RICHERT & R. J. BLOOM: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1889, 1959.
WESTERFELD, RICHERT & E. S. HIGGINS: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1897, 1959.