

Laboratorio de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Influencia de algunos agentes terapéuticos sobre la biosíntesis del ácido úrico

por

J. Ramia, J. Bozal y F. Calvet

(Recibido para publicar el 30 de junio de 1966)

La correlación que existe entre el síndrome gotoso y la hiperuricemia es un hecho bien conocido, a pesar de que permanecen sin aclarar los mecanismos fisiopatológicos responsables. Tampoco se conocen los modos de actuación de varias de las sustancias medicamentosas que, de un modo empírico, se administran con éxito para el tratamiento de los pacientes gotosos y reumáticos.

La xantindeshidrogenasa hepática es un enzima que cataliza la producción de ácido úrico a partir de bases púricas; en trabajos previos realizados en este Laboratorio (7, 8), se ha observado que, trabajando *in vitro* con homogenados de hígados de pollo y humano, la colchicina y la fenilbutazona inhiben competitivamente la oxidación enzimática de la xantina a ácido úrico.

Por otra parte, hemos podido comprobar que, análogamente a lo que se observó en el caso de la xantinoxidasas de la leche, HOFSTEE (4), el enzima presen-

te en los hígados de pollo y de cerdo, así como el procedente de leucocitos de caballo, resultan inhibidos por un exceso del propio sustrato, la xantina.

Las inhibiciones provocadas tanto por los mencionados fármacos como por el sustrato podrían contribuir a una regulación (limitación) de la producción de ácido úrico, en cuyo fenómeno encontrarían parcial explicación los beneficiosos efectos terapéuticos ejercidos por varias de las sustancias empleadas como agentes antigotosos y antirreumáticos, así como el que no tenga lugar una superproducción úrica en el hígado de los animales sanos, incluso en el caso de que haya una acumulación extraordinaria de bases purínicas.

Después de estudiar *in vitro* la acción de diversos agentes, sobre el sistema xantina-xantindeshidrogenasa, hemos comprobado también su actuación sobre hígados aislados perfundidos, y finalmente, sus efectos sobre animales vivos.

Material y métodos

Se trabajó con la xantindeshidrogenasa presente en homogenados de hígados de pollo, rata, ratón y cerdo, y de leucocitos de équido. Las glándulas hepáticas se obtuvieron de animales recién sacrificados y se conservaron congeladas. A partir de las mismas, se prepararon los homogenados, desintegrando el parénquima celular suspendido en tampón fosfato 0,05 M de pH 7,4, mediante una batidora electromecánica. Se prepararon suspensiones de 1 g de tejido por cada 5 ml de tampón, las cuales se utilizaron recién preparadas.

Las experiencias de perfusión se realizaron trabajando con el hígado aislado de pollos ligeramente anestesiados previamente con éter. Se canula la vena porta, según la técnica descrita por MILLER (9), e inmediatamente se procede a un previo lavado de la sangre de la glándula haciendo circular disolución Ringer a 40° C (150-200 ml). El hígado canulado se disea, situándolo después sobre la placa de un embudo de Buchner previamente colocado en una estufa termostática regulada a $40 \pm 0,1^\circ$ C y cuyo ambiente se mantiene saturado de humedad.

La perfusión del órgano se lleva a cabo introduciendo el líquido por la vena porta, y dejándolo fluir libremente por los otros vasos seccionados. Para ello, la cánula portal se conecta mediante un tubo de goma y una T, a dos recipientes situados a unos 40-50 cm de altura por encima de la glándula, los cuales contienen las dos disoluciones que alternativamente se emplean en la perfusión. Como sendos líquidos de trabajo se utilizaron una disolución Ringer, a pH 7,4, que contiene adicionados xantina (10^{-3} M) y azul de metileno (0,112 g/l), y otra disolución de las mismas características que además contiene la droga cuya acción inhibitoria se ensaya ($2,10^{-2}$ M).

La respiración del tejido hepático parece garantizada manteniendo saturadas

de oxígeno las disoluciones de perfusión (en las condiciones operantes se hacen perfundir unos 1000 ml de disolución en dos horas, que aportan unos 31.600 mm³ de oxígeno disuelto). Según RICHERT y WESTERFELD (loc. cit.) un hígado de 80 g de peso consume unos 74 mm³ de oxígeno en 20 min. a 56° C). En los líquidos recogidos se determina la cantidad de ácido úrico presente, formado a partir de la xantina perfundida.

Las experiencias *in vivo* se llevaron a cabo utilizando ratas blancas Vistar, y polluelos de 8-15 días. Se agruparon en dos lotes de seis animales cada uno, a los que se inyectó intraperitonealmente, o bien 1 ml de suero fisiológico (o de suero adicionado de alcohol al 8 %) o bien 1 ml de disolución del fármaco objeto de ensayo, en suero fisiológico (o en suero hidroalcohólico).

El intervalo de tiempo transcurrido entre la administración de la droga y el sacrificio de los animales fue variable, según el ritmo de eliminación de aquella observado. Los animales se sacrificaron por decapitación, procediéndose inmediatamente a su sangrado y en su caso, conservando la sangre por adición de citrato sódico al 3,8 %. Con la glándula hepática eviscerada se prepararon homogenados, y se realizaron las debidas incubaciones, para la determinación de su actividad xantindeshidrogenásica.

En las experiencias efectuadas con leucocitos se utilizaron los de sangre de équido citratada, separados por centrifugación y empleando las técnicas habituales (10). Con los leucocitos recién obtenidos se prepararon los homogenados con auxilio de un homogeneizador manual de Potter-Elvehjen, determinándose su actividad enzimática.

La xantina, el azul de metileno y los productos cuyas acciones se han estudiado, fueron de calidad reactivo y de diversas procedencias comerciales acreditadas.

La disolución de xantina empleada

como sustrato se preparó disolviendo la base en un pequeño volumen de agua adicionada de unas gotas de NaOH 0,05 N, y diluyendo posteriormente con tampón fosfato 0,05 M de pH 7,4, hasta el volumen establecido. Esta disolución se empleó recién preparada. El líquido Ringer se obtuvo disolviendo tabletas Oxoid (de Oxo Ltd.) y ajustando finalmente el pH a 7,4.

La actividad xantindeshidrogenásica se determinó midiendo la cantidad de ácido úrico formada en un tiempo establecido, al incubar disoluciones constituidas por volúmenes determinados de homogenado, de disolución de xantina, de tampón fosfato de pH 7,4, de azul de metileno 0,01 M (0,5 ml), en presencia y en ausencia de los fármacos cuya acción se ensaya; el volumen total de la muestra en incubación fue de 16 ml, y la temperatura de $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$. La acción enzimática se interrumpió por adición de 4 ml de disolución de ácido perclórico al 5 %. En los filtrados se determinó el ácido úrico mediante el método colorimétrico que utiliza el reactivo de BROWN (2); los detalles operatorios fueron previamente publicados (7).

La determinación de fenilbutazona en sangre o tejidos se realizó por el método de HOFFMANN (3), la de antipirina, por el método propuesto por BRODIE (1), y la de ácido salicílico, mediante la técnica descrita por SMITH (11).

PARTE EXPERIMENTAL

Inhibición de la actividad xantindeshidrogenásica por el propio sustrato

Se ha observado que la actividad de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo, de cerdo y de leucocitos, resultan inhibidas *in vitro* por el propio sustrato xantina, si las concentraciones de ésta en el medio, son superiores a 10^{-4}M (condiciones aerobias y en presencia de azul de metileno). La figura 1 muestra las va-

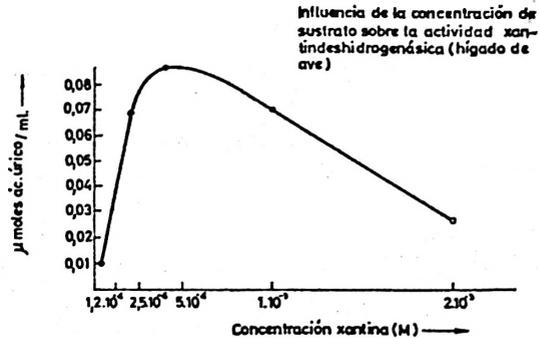


FIG. 1

riaciones de actividad que experimenta la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo al aumentar la concentración de xantina.

Resultados similares se han obtenido con el enzima procedente de cerdo y de leucocitos. Nuestros resultados ponen de relieve la existencia de un fenómeno exhibido por la xantindeshidrogenasa hepática, que es análogo al establecido por Hofstee (loc. cit.) con la xantinodasa de la leche.

Acción de algunos fármacos antigotosos y antirreumáticos sobre la xantindeshidrogenasa de diversos orígenes

La tabla I muestra el comportamiento exhibido por diversos agentes antigotosos, antirreumáticos y otros compuestos relacionados, sobre el sistema xantina-xantindeshidrogenasa.

Los resultados ponen de manifiesto las potentes acciones inhibitoras ejercidas por la colchicina, la fenilbutazona, el salicilato y el acetilsalicilato sódicos. La colchicina es, en general, la que ejerce una acción inhibitora más relevante, excepto cuando actúa sobre el enzima de leucocitos. Además, algunos derivados bencénicos como el ácido p-aminobenzoico y el ácido p-hidroxibenzoico, también ejercen acciones inhibitoras, si bien su significado farmacológico o terapéu-

TABLA I

Inhibiciones provocadas por algunos fármacos sobre la xantindeshidrogenasa de diversos orígenes.

Inhibidor	Conc. $M \times 10^{-3}$	XDHasa de pollo (1) % inhibición	XDHasa de cerdo (2) % inhibición	XDHasa de leucocitos (3) % inhibición
Colchicina	6,25	50	91	26
Colchicina	3,12	—	64	15
Fenilbutazona	6,25	30	27	34
Fenilbutazona	3,12	10	10	29
Ac. salicílico	6,25	40	85	85
Ac salicílico	3,12	20	71	72
Ac. acetilsalicílico	6,25	—	60	79
Ac. acetilsalicílico	3,12	40	50	62
Ac. p-hidrobenzoico	6,25	35	50	57
Ac. p-hidrobenzoico	3,12	11	10	43
Ac. p-aminobenzoico	6,25	18	47	36
Ac. p-aminobenzoico	3,12	12	20	20
Antipirina	6,25	11	30	20
Antipirina	3,12	5	10	6
Hidroxilamina	6,25	70	67	88
Hidroxilamina	3,12	60	51	65
Semicarbacida	6,25	NO	NO	NO

(1) 0,05 g Hígado en 7,5 ml incubado; Xantina $8,75 \cdot 10^{-5}$ M; $t = 9$ min.

(2) 0,5 g Hígado en 8 ml incubado; Xantina $5 \cdot 10^{-5}$ M; $t = 13$ min.

(3) 0,5 g Leucocitos en 8 ml incubado; Xantina $5 \cdot 10^{-5}$ M; $t = 60$ min.

tico no es bien conocido. Sus actividades contrastan con la débil influencia de la antipirina, fármaco de reconocida acción antiflogística.

Los reactivos de los grupos carbonilo, tales como la hidroxilamina y la semicarbacida, exhiben un comportamiento dispar; mientras que la primera ejerce destacada acción inhibitoria de la actividad xantindeshidrogenásica, la segunda se muestra como inactiva. Nuestros resultados con semicarbacida difieren de los obtenidos por WESTERFELD y col. (13) con la xantinoxidasa de la leche; pero son paralelos a los obtenidos con el enzima de hígado de pollo por MARÍN y otros (loc. cit.), y con xantindeshidrogenasa de hígado humano por MARTÍN y otros (loc. cit.), por lo que se refiere a las acciones de la colchicina y la fenilbutazona; nuestros resultados con colchicina no concuerdan, sin embargo, con los publicados por VILLELA (12).

En conjunto, los valores obtenidos permiten establecer que existe una analogía de comportamiento enzimático entre las xantindeshidrogenasas de hígado de pollo, humano, de cerdo y de leucocitos, que las diferencia sensiblemente de la xantinoxidasa láctea.

Naturaleza de las inhibiciones

En un trabajo previo realizado en este Laboratorio por MARÍN y otros (loc. cit.) se determinaron los valores de K_m para la xantindeshidrogenasa hepática de pollo frente a su sustrato xantina, y los de las K_i correspondientes al sistema enzimático en presencia de colchicina y de fenilbutazona, respectivamente. Nosotros hemos determinado los valores de las K_i del sistema en presencia de algunas de las sustancias más interesantes como agentes terapéuticos que, ensayadas por nosotros, han mostrado acción inhibitoria sobre el enzima; para la expresión de

TABLA II
Constantes de inhibición (K_i) de diversos fármacos sobre el sistema xantindeshidrogenasa (hígado de pollo)-xantina.

Inhibidor	Conc. M 10^{-3}	K_i hallado	K_i Valor medio
Ac salicílico	3,12	$3,4 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^{-3}$
Ac salicílico	5,00	$3,0 \cdot 10^{-3}$	
Ac acetilsalicílico	1,56	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$
Ac acetilsalicílico	3,12	$2,7 \cdot 10^{-3}$	
Ac p-hidroxibenzoico	3,12	$5,68 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-3}$
Ac p-hidroxibenzoico	6,25	$5,58 \cdot 10^{-3}$	
Ac p-aminobenzoico	3,12	$1,35 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$
Ac p-aminobenzoico	6,25	$1,25 \cdot 10^{-2}$	
Antipirina	3,12	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$2,72 \cdot 10^{-2}$
Antipirina	6,25	$2,74 \cdot 10^{-2}$	
Colchicina	5,00	$2,85 \cdot 10^{-2}$	$2,72 \cdot 10^{-2}$
Fenibultazona	10,00	$2,72 \cdot 10^{-2}$	

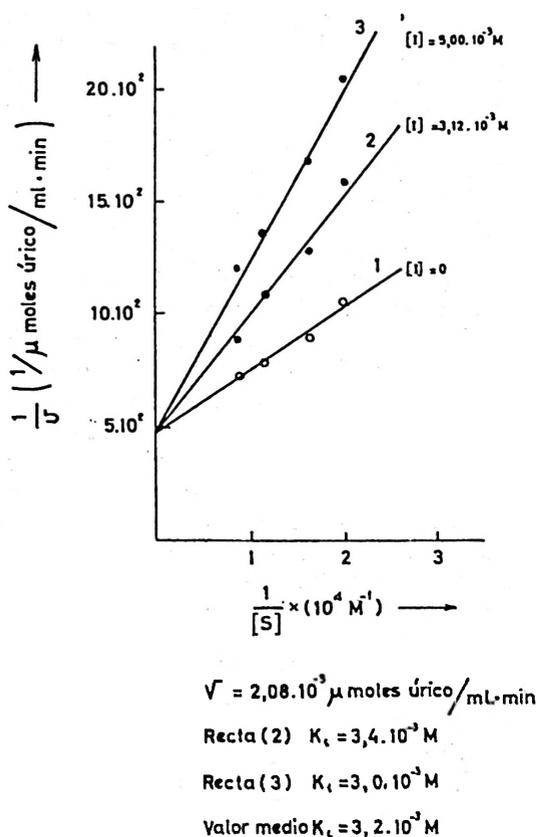


FIG. 2. Determinación de K_i para el ácido salicílico.

los valores experimentales se ha utilizado la representación gráfica de LINEWEAVER-BURK (6).

Los valores de las K_i aparecen en la tabla II, en la que se incluyen los correspondientes a la colchicina y fenilbutazona (loc. cit.) con fines comparativos.

La figura 2 muestra las determinaciones experimentales correspondientes al ácido salicílico.

Los productos reseñados en la tabla II se muestran como inhibidores competitivos de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo. Los valores de las K_i del ácido salicílico y del ácido acetilsalicílico, que son dos de los más tradicionales agentes antirreumáticos, resultan ser de un orden de magnitud parecido al de la colchicina y la fenilbutazona.

Experiencias de perfusión de hígado de pollo

Los positivos resultados de inhibición obtenidos *in vitro* con los diversos fármacos antes citados nos indujeron al estudio de su acción sobre la producción glandular de ácido úrico, empleando la técnica de perfusión del hígado de pollo aislado.

Como líquido de perfusión se utilizó una disolución Ringer de pH 7,4, que

contenía, además, xantina ($10^{-3}M$) y azul de metileno (0,112 g/l), y otra disolución de igual composición, pero adicionada de la sustancia inhibidora cuya acción se ensaya.

El experimento se inicia perfundiendo el hígado con la disolución Ringer que contiene xantina y azul de metileno; se introduce gradualmente por la vena por-

termina el correspondiente contenido en ácido úrico.

Finalmente, la glándula se perfunde de nuevo con la disolución inicial de xantina y azul de metileno (exenta de inhibidor), con lo que se observa una recuperación gradual y rápida de la producción original de ácido úrico.

En la figura 3 se muestra la variación

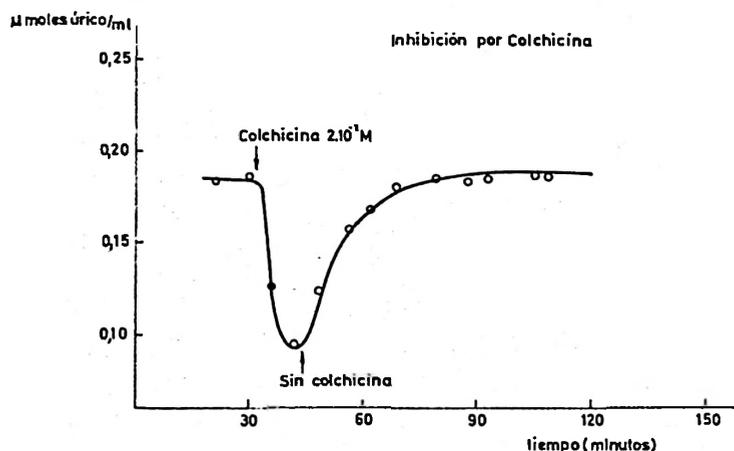


FIG. 3

ta canulada (véase Materiales y métodos), haciendo pasar unos 200 ml de la misma, a lo largo de unos 30 minutos. El líquido perfundido durante este intervalo de tiempo se desprecia. Se continúa la perfusión con nuevas cantidades de líquido, recogiendo fracciones de 50 ml cada 10 minutos, de las que se toman muestras de 4 ml que, una vez defecadas con 1 ml de ácido perclórico al 5 %, se utilizan para determinar colorimétricamente, mediante el reactivo de Brown (loc. cit.), su contenido en ácido úrico.

Una vez conseguida una producción de ácido úrico estabilizada, se inicia la perfusión con la disolución que contiene el presunto inhibidor cuya acción se ensaya, recogiendo sendas fracciones de 50 ml de líquido perfundido, y analizándolas mediante toma de muestras de 4 ml que se defecan con 1 ml de ácido perclórico al 5 %, y en las que se de-

de la producción de ácido úrico observada al perfundir el hígado con una disolución que contiene colchicina; con las demás sustancias empleadas las curvas muestran aspecto semejante.

La tabla III recoge los resultados obtenidos en los diversos experimentos de perfusión.

Es de notar que en la perfusión con disoluciones de elevada concentración de xantina, $1,5 \cdot 10^{-2}M$, no se produce el fenómeno de la inhibición por exceso de sustrato (observado *in vitro* con los homogenados hepáticos), probablemente debido a que no se deben conseguir niveles elevados de xantina en el interior de los citoplasmas celulares, como consecuencia de una penetración demasiado lenta de la base a través de la pared de la célula hepática.

En cambio, los diversos fármacos antirreumáticos ensayados manifiestan, en

TABLE III
Experiencias de perfusión.

Inhibidor	ml inhibidor perfundidos	Concen- tración inhibidor	Concen- tración xantina	Peso hígado	Máxima inhibición	Gráfica n.º
NaCl	100 ml	2.10^{-2} M	1.10^{-3} M	40 g	No inhibe	16
Xantina	100 ml	$1,5.10^{-2}$ M	2.10^{-4} M	32 g	No inhibe	17
Antipirina	100 ml	2.10^{-2} M	1.10^{-3} M	41 g	23 %	18
Fenilbutazona	150 ml	2.10^{-2} M	1.10^{-3} M	45 g	56 %	19
p-aminobenzoico	100 ml	2.10^{-2} M	1.10^{-3} M	36 g	30 %	20
p-hidroxibenzoico	100 ml	2.10^{-2} M	1.10^{-3} M	44 g	48 %	21
Acido salicílico	100 ml	2.10^{-2} M	1.10^{-3} M	49 g	48 %	22
Acido acetilsalicílico	100 ml	2.10^{-2} M	1.10^{-3} M	44 g	48 %	23
Colchicina	100 ml	2.10^{-2} M	1.10^{-3} M	39 g	48,4 %	24

estas condiciones, una potente acción inhibidora de la xantindeshidrogenasa. Destaca el que la glándula hepática recupera su actividad xantindeshidrogenásica original con mayor rapidez después de haber ensayado el efecto del ácido salicílico, el ácido acetilsalicílico, el ácido p-aminobenzoico y el ácido p-hidroxibenzoico, que cuando se ha experimentado la acción de la colchicina, de la fenilbutazona o de la antipirina.

Inhibición de la xantindeshidrogenasa hepática in vivo, por fármacos antigotosos y antirreumáticos

De los animales en estudio, polluelos de 8-15 días y ratas Vistar adultas, una vez tratados como se describe en el apartado Materiales y métodos, se obtuvo un homogenado hepático y se determinó su actividad en presencia de azul de metileno.

Las mezclas de incubación utilizadas para el estudio analítico contenían 1 ml de homogenado (1 g de hígado en 10 ml de suspensión, cuando se ensayó con pollos, y 1 g en 5 ml en los experimentos realizados con ratas); se empleó 0,5 ml de azul de metileno 0,01 M, y volúmenes adecuados de tampón fosfatos 0,05 M de pH 7,4 y de disolución de xantina $2,10^{-4}$ M, hasta completar 16 ml. Las incubaciones se realizaron a $25 \pm 0,1^{\circ}$ C,

y se tomaron volúmenes de 4 ml a intervalos de 3, 6, 9 y 12 min., que se vertieron sobre 1 ml de ácido perclórico al 5 por 100. En los filtrados perclóricos se determinó el ácido úrico colorimétricamente, mediante el reactivo de Brown (loc. cit.).

Experiencias con colchicina

En un experimento tipo se inyectaron 6 ratas blancas Vistar de 200 g de peso, por término medio, con 0,2 mg de colchicina disueltos en 1 ml de suero fisiológico alcohólico al 8 %, empleando otros seis animales como control, a los que se inyectó 1 ml de suero fisiológico hidroalcohólico al 8 %.

Al cabo de 24 horas los animales se sacrificaron, reuniéndose los hígados de los 6 animales control y, separadamente, de los 6 inyectados con colchicina, preparando sendos homogenados en los que se determinó la actividad xantindeshidrogenásica. Dicha actividad se evaluó en 0,099 μ mol/g de hígado/min. en los animales control y de 0,048 μ mol/g hígado/min. en los animales inyectados con colchicina, lo que representa una inhibición del 51,5 %.

En la tabla IV se resumen los resultados obtenidos en las diversas experiencias realizadas con colchicina. Debe observarse que la dosis inyectada (1 mg de

TABLA IV

Inhibiciones «in vivo» de la xantindeshidrogenasa inducidas por administración intraperitoneal de colchicina 1 mg/kg de animal.

Experiencia	Especie animal	Actividad xantindeshidrogenásica media en μ moles úrico/g hígado/min (U.I.)	Inhibición
E 1	6 ratas control	0,099	51,5 %
	6 ratas inyectadas	0,048	
E 2	6 ratas control	0,131	49,6 %
	6 ratas inyectadas	0,066	
E 3	6 pollos control (de 30 días)	0,384	35,0 %
	6 pollos inyectados	0,250	
E 4	6 pollos control (de 23 días)	0,384	33,3 %
	6 pollos inyectados	0,256	
E 5	6 pollitos control (de 23 días)	0,440	31,1 %
	6 pollitos inyectados	0,303	
E 6	6 pollos control (de 15 días)	0,192	30,6 %
	6 pollos inyectados	0,132	

colchicina/kg de animal) representa el 30 % de la LD_{50} colchicina (3,5 mg colchicina/kg animal).

Si se supone que la droga se distribuyera uniformemente por todos los órganos del animal (lo cual no debe ser cierto) y conocido el peso de éste, puede calcularse que en una rata de 200 g de peso el nivel del fármaco en sus tejidos sería $2,5 \cdot 10^{-6}$ M, concentración muy pequeña comparada con la necesaria, $6 \cdot 10^{-3}$ M (unas 2000 veces mayor), para provocar *in vitro*, parecido porcentaje de inhibición (50 %).

Representando gráficamente (fig. 4) los valores de r/V frente a r/S , en las determinaciones efectuadas con homogenados de hígado de pollo (animales de 15 días, experimento E₆, tabla IV) no tratados e inyectados con colchicina, y aplicando la ecuación de Lineweaver-Burk (loc. cit.), se obtiene para los ani-

males control el valor de K_m de la xantindeshidrogenasa como igual a $3,3 \cdot 10^{-5}$; pero cuando se realiza análoga determinación con el homogenado de animales inyectados con colchicina, el valor que resulta es de $6,4 \cdot 10^{-5}$, lo que indica que el enzima se halla inhibido por el alcaloide.

Los métodos analíticos que hemos estudiado no nos han permitido, por sus límites de sensibilidad, la determinación de colchicina en tejidos o en suero.

Experiencias con fenilbutazona

El fármaco se inyectó intraperitonealmente en dosis comprendidas entre el 40 y 80 % de la LD_{50} (215 mg/kg intraperitoneal). Los animales control recibieron 1 ml de disolución de suero fisiológico, y el resto 1 ml de disolución de fenilbutazona (6 mg/ml) a pH 7,4.

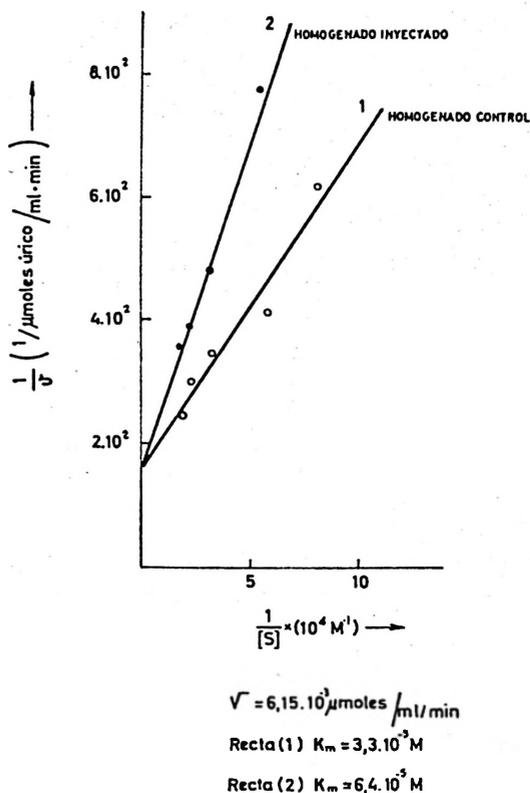


FIG. 4. Determinación de K_i aparente de la colchicina.

En las experiencias realizadas con ratas, los animales se sacrificaron una vez transcurridos períodos de tiempo com-

prendidos entre los 90 minutos y las 6 horas después de la inyección, pero no se observó disminución alguna de su actividad xantindeshidrogenásica hepática. Análogo resultado se obtuvo al trabajar con lotes de polluelos de 8-10 días, que se sacrificaron 3 y 6 horas después de inyectados.

Los niveles hepático y sanguíneo de fenilbutazona alcanzados, que fueron del orden de 10^{-4} M , determinados por el método de Herrmann (loc. cit.), son inferiores a las concentraciones que producen inhibición *in vitro* y por perfusión ($3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) del órgano aislado.

Experiencias con ácido salicílico

Se estableció previamente la LD_{50} con polluelos, igual a 1 g/kg, y en los ensayos se administraron las cantidades del ácido que aparecen consignadas en la tabla V. Se emplearon disoluciones de salicilato sódico convenientemente ajustadas a pH 7,4.

A los animales control se les inyectó 1 ml de disolución salina isotónica (NaCl 0,9 %). Se determinó la actividad xantindeshidrogenásica en los homogenados de hígado, y el nivel de ácido salicílico en el tejido hepático y en sangre, por el método de Smith (loc. cit.).

Las experiencias reunidas en la tabla V muestran que, a pesar de haberse

TABLA V

Inhibición «in vivo» de la xantindeshidrogenasa hepática por el ácido salicílico.

Especie y número	% de la LD_{50} inyectada	Sacrificados a las	Concentración en suero	Concentración en hígado (M)	Inhibición
6 pollos	6 %	12 horas	—	—	ninguna
6 pollos	70 %	1 hora	11,4 mg/100 ml ($8,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)	$1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	5-8 %
6 pollos	100 %	1 hora	97,6 mg/100 ml ($7,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)	$3,8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	15 %
6 pollos	80 %	3 horas	25,3 mg/100 ml ($1,8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)	$2,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	5-8 %

obtenido un elevado nivel sanguíneo del fármaco, sólo se observan pequeños descensos de su actividad xantindeshidrogenásica hepática *in vivo* (del 15 % como máximo). Estos resultados son parejos a los obtenidos *in vitro* con semejantes concentraciones del fármaco (compárese con tabla I).

Experiencias con antipirina

Polluelos de 10-15 días, inyectados intraperitonealmente con 1 ml de la disolución del fármaco, conteniendo cantidades que representan del 80 al 50 % de la LD₅₀, no experimentaron alteración sensible de la xantindeshidrogenasa hepática, aun habiéndose logrado niveles hepáticos aproximados de $2,7 \cdot 10^{-3}$ M, y concentraciones sanguíneas de 22,1 mg/100 ml de suero, determinados por el método de Brodie (loc. cit.).

Discusión

Los resultados obtenidos permiten resaltar el significado fisiológico que pueden tener nuestras observaciones sobre la inhibición de la xantindeshidrogenasa de diversos orígenes (ave, cerdo, leucocitos), por su propio sustrato xantina, cuando la concentración de ésta es superior a 10^{-4} M. Como quiera que el nivel fisiológico normal de la mencionada purina en el hígado de diversos animales es del orden citado, consideramos que nuestras observaciones pueden sugerir la existencia natural de un posible mecanismo de regulación (limitación) de la uricogénesis, dado que, según ello, en el caso de una acumulación excesiva de xantina en el hígado del animal, se limitaría automáticamente una producción exagerada de ácido úrico.

Los diversos fármacos antigotosos, antirreumáticos y drogas relacionadas que hemos ensayado, se comportan *in vitro*

como inhibidores de la actividad de la xantindeshidrogenasa de diversas procedencias. Hemos podido establecer el carácter competitivo de los siguientes inhibidores del enzima: ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido p-aminobenzoico y antipirina.

Se observa un paralelismo entre los resultados obtenidos al ensayar la acción inhibidora *in vitro* con los que se consiguen en la perfusión de la glándula hepática de pollo con disoluciones de los correspondientes fármacos.

Esta correspondencia no se observa siempre con los efectos provocados por algunas de las sustancias, cuando se administran a animales vivos por vía parenteral. En efecto, los ácidos salicílico y acetilsalicílico, que ensayados *in vitro* y por perfusión se muestran como potentes inhibidores de la actividad xantindeshidrogenásica del hígado, cuando son inyectados intraperitonealmente a ratas o polluelos apenas muestran influencia apreciable sobre la actividad del enzima de sus hígados; tan sólo se consiguen inhibiciones del 15 % en los animales así tratados. La explicación reside, seguramente, en el hecho de que no se pueden conseguir niveles elevados de estos fármacos en el hígado del animal tratado por inyección intraperitoneal: de hecho, la magnitud de la inhibición provocada corresponde a la observada *in vitro* con los homogenados hepáticos en presencia de análogas concentraciones de los fármacos ensayados.

La fenilbutazona y la antipirina se muestran como potentes inhibidores competitivos *in vitro*, y también inhiben la producción de ácido úrico por la glándula hepática al perfundirla con disoluciones de los fármacos; no hemos observado, sin embargo, que ejerzan acción alguna sobre la actividad de la xantindeshidrogenasa hepática de pollos inyectados intraperitonealmente. Es de destacar, no obstante, que los niveles hepático

y sanguíneo que hemos podido alcanzar con las mencionadas sustancias tampoco producen inhibición al experimentar *in vitro* con homogenados. A pesar de que en todos los casos los animales se inyectaron con dosis elevadas (próximas a la LD_{50}) de los fármacos, es probable que el ritmo de su eliminación sea lo suficientemente rápido para evitar su acumulación, siquiera temporal. El sacrificio de los animales a distintos intervalos de tiempo después de la inyección, condujo siempre a los mismos resultados.

La beneficiosa acción terapéutica ejercida por los ácidos salicílico y acetilsalicílico y por la fenilbutazona no parecen derivar, por tanto, de los efectos inhibidores que puedan ejercer sobre la xantindeshidrogenasa de diversos órganos *in vivo*, sino de posibles acciones efectuadas sobre otros sistemas que intervienen en el metabolismo purínico.

La colchicina, agente antigotoso que ejerce los efectos terapéuticos más acusados, manifiesta su acción inhibidora sobre la xantindeshidrogenasa cuando se trabaja *in vitro* o por perfusión de la glándula hepática; el aparente efecto inhibidor del fármaco sobre la uricogénesis es, sin embargo, mucho más acusado cuando actúa *in vivo*.

En efecto, al determinar el valor de la K_m para el sistema xantina-xantindeshidrogenasa de hígado de pollo, en animales tratados o no con colchicina (intra-peritonealmente), se pone de manifiesto la menor actividad del enzima en el hígado de los animales inyectados.

El hecho encontraría su paralelismo en las pequeñas dosis terapéuticas administradas que resultan efectivas en los pacientes gotosos: la dosis de colchicina para un paciente de 60-70 kg de peso es de 10 mg en dos días; admitiendo la acumulación del fármaco y su distribución uniforme, significaría una concentración de colchicina igual a $4 \cdot 10^{-7}$ M, la cual *in vitro* no produciría efecto inhibidor alguno.

El resultado logrado al administrar dosis pequeñas de colchicina parece indicar que la acción terapéutica de la colchicina no sea atribuible a una simple inhibición de la xantindeshidrogenasa hepática o de otros tejidos, sino a efectos más complejos sobre otros sistemas que, probablemente, actúan acoplados con el de la xantindeshidrogenasa.

Podría adelantarse la hipótesis de una posible interferencia del alcaloide con la propia biosíntesis del enzima. Son conocidas las propiedades antimetabólicas de la colchicina, manifiestas ya a concentraciones muy bajas (1 parte por billón); se puede suponer que dichos efectos sean el resultado de una interferencia del producto sobre diversas acciones enzimáticas de la célula y sobre la inducción sintética de los propios enzimas, entre ellos de la xantindeshidrogenasa.

La actividad antimetabólica del fármaco pudiera explicar la observación de HOWELL y col. (5) de que la colchicina inhibe la acción fagocitaria realizada por los leucocitos sobre los cristales de ácido úrico depositados en el líquido sinovial. Nosotros hemos demostrado la inhibición de la xantindeshidrogenasa de leucocitos por la colchicina, pero al trabajar con una suspensión de leucocitos en una disolución Ringer que contenía también urato sódico 10^{-4} M, no hemos observado la menor alteración del contenido de ácido úrico de la disolución.

Resumen

La actividad xantindeshidrogenásica de los homogenados de hígado de pollo, de rata, de cerdo y de la presente en los leucocitos eosinófilos es inhibida *in vitro* por el propio sustrato, xantina, cuando la concentración de la base es superior a 10^{-4} M.

Las sales sódicas de los ácidos salicílico ($6,25 \cdot 10^{-3}$ M; 40%), acetilsalicílico ($3,12 \cdot 10^{-3}$ M; 40%), p-hidroxibenzóico ($6,25 \cdot 10^{-3}$ M; 32%), y p-aminobenzóico ($6,25 \cdot 10^{-3}$ M; 18%), así como la fenilbutazona ($6,25 \cdot 10^{-3}$ M; 30%), la colchicina ($6,25 \cdot 10^{-3}$ M; 50%) y la

antipirina ($6,25 \cdot 10^{-3}$ M; 11 %), inhiben *in vitro* la actividad xantindeshidrogenásica de los homogenados hepáticos de ave, de cerdo y de leucocitos.

Trabajando con homogenados de hígado de pollo se ha observado que los siguientes fármacos son inhibidores competitivos de la xantindeshidrogenasa, habiéndose establecido las correspondientes constantes de inhibición: ácido salicílico ($K_i = 3,2 \cdot 10^{-2}$ M), ácido acetilsalicílico ($K_i = 2,8 \cdot 10^{-3}$ M), ácido p-hidroxibenzoico ($K_i = 5,5 \cdot 10^{-3}$ M), ácido p-aminobenzoico ($K_i = 1,5 \cdot 10^{-2}$ M) y antipirina ($K_i = 2,72 \cdot 10^{-2}$ M).

La perfusión de la glándula hepática de pollo con disoluciones Ringer que contienen xantina (10^{-3} M), azul de metileno ($3 \cdot 10^{-1}$ M) y una de las drogas antigotosas, antirreumáticas o antiflogísticas que a continuación se mencionan, inhibe la producción de ácido úrico por la glándula en magnitudes semejantes a las observadas al experimentar *in vitro*: colchicina ($2 \cdot 10^{-2}$ M; 48 %), fenilbutazona (10^{-3} M; 56 %), ácido salicílico ($2 \cdot 10^{-2}$ M; 48 %), ác. acetilsalicílico ($2 \cdot 10^{-2}$ M; 48 %), ác. p-hidroxibenzoico ($2 \cdot 10^{-2}$ M; 48 %), ácido p-aminobenzoico ($2 \cdot 10^{-2}$ M; 30 %) y antipirina ($2 \cdot 10^{-2}$ M; 23 %).

La inyección intraperitoneal de colchicina (30 % LD₅₀) en pollos y ratas disminuye la actividad de la xantindeshidrogenasa presente en el hígado, demostrable por la menor cantidad de ácido úrico producida al incubar con xantina los homogenados de hígado de los animales inyectados.

La determinación del valor de Km en los animales control, proporciona un valor igual a $3 \cdot 10^{-3}$ M, en tanto que la determinación análoga para los que han sido paralelamente inyectados con colchicina da el valor de $6 \cdot 10^{-3}$ M (0,06 mg del alcaloide a animales de 60-70 g). Los hechos experimentales ponen de manifiesto que los efectos de la colchicina *in vivo* son mucho más acusados que la acción ejercida por el fármaco *in vitro* o por perfusión sobre la actividad de la xantindeshidrogenasa.

Las sales sódicas de los ácidos salicílicos y acetilsalicílico administradas a pollos intraperitonealmente (70 y 80 % de LD₅₀, respectivamente) sólo inducen una ligera inhibición de la actividad enzimática (15 %), mientras que la fenilbutazona y la antipirina (LD₅₀) no parecen ejercer efecto alguno en dichas condiciones.

Summary

Therapeutic agents and acid uric biosynthesis

Liver xantindehydrogenase of various sources -chicken, rat and pig appears to be inhibited by an excess of substrate [Xantine] $\geq 10^{-4}$ M. A similar phenomenon has been observed with the dehydrogenase present in horse leucocytes.

The following drugs behave *in vitro* as competitive inhibitors of chicken xantindehydrogenase, and the corresponding inhibition constants (K_i) have been established: salicylic, acetylsalicylic, p-hydroxybenzoic and p-aminobenzoic acids, phenylbutazone, colchicine and antipyrine.

When an isolated chicken liver is perfused with any of the mentioned drugs, the uricogenic rate of the gland is correspondingly reduced.

Intraperitoneal administration of colchicine to rats and chickens, appears to greatly diminish liver xantindehydrogenase activity. Similar experiments performed by injecting salicylic and acetylsalicylic acids, or phenylbutazone, seem to reduce only slightly the activity of the enzyme.

The powerful effects induced *in vivo* by the injection of colchicine to animals, and the excellent therapeutical results obtained when small doses of the alkaloid are given to gouty patients, cannot be simply explained by its inhibitory action upon xantindehydrogenase. Some experiments we have in course indicate that colchicine also interferes with other enzymatic systems which seem to work coupled with xantindehydrogenase in the hepatic cell.

Bibliografía

- 1) BRODIE, B. B., y AXELROD, J.: *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **98**, 97, 1950.
- 2) BROWN, H.: *J. Biol. Chem.*, **158**, 600, 1945.

- (3) HERRMANN, B.: *Med. Exptl.* **1**, 170, 1959.
- (4) HOFSTEE, B.H.J.: *J. Biol. Chem.*, **216**, 235, 1962.
- (5) HOWELL, R. R., FENEAS, E. D., y SEEGMILLER, J. E.: *Arthritis Rheum.* **6**, 97, 1963.
- (6) LINEWEAVER, H., y BURK, D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658, 1934.
- (7) MARÍN, A., MARTÍN-ESTEVE, y J., CALVET, F.: *R. esp.-Fistol.*, **20**, 165, 1964.
- (8) MARTÍN-ESTEVE, J., BOZAL, F.: *A.I.R.*, **7**, 456, 1964.
- (9) MILLER, L. L., ELY, C. G., WATSON, M. L., y BALE, W. F.: *J. Exptl. Med.*, **94**, 431, 1951.
- (10) RAUEN, H. B., «Biochemisches Taschenbuch», p. 916. Springer Verlag, 1956.
- (11) SMITH, M.J.H.: *J. Pharm. Pharmacol.*, **3**, 413, 1951.
- (12) VILLELA, G. G., ALFFONSO, O. R., MITTIERI, F.: *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 78, 1961.
- (13) WESTERFELD, W. W., RICHERT, D. A., BLOOM, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1889, 1959.

