

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Barcelona

Acerca de la formación de ácido úrico por la xantindeshidrogenasa hepática

por

E. Domingo (*), J. Bozal y F. Calvet

(Recibido para publicar el 29 de mayo de 1967)

La actividad xantindeshidrogenásica del hígado de rata experimenta un notable incremento de nivel en los animales a los que se inyecta xantina intraperitonealmente; se ha sugerido se trate de un enzima adaptativo, y que la concentración enzimática aumente correlativamente con la de base púrica (3, 4). Tal vez responda a un fenómeno de inducción del enzima.

En cambio, experimentando con polluelos a los que se administraron diversas purinas (xantina, hipoxantina, guanina, adenina, guanosina) (13), bien incorporadas a la dieta o por inyección intraperitoneal, se observó que no se producía variación alguna de la actividad xantindeshidrogenásica hepática, mientras que la administración de inosina determinaba un acusado aumento de producción de ácido úrico. Se interpretaron estos hechos como una respuesta adaptativa del enzima frente a la inosina o a alguno de sus metabolitos (loc. cit.).

A pesar de las discrepancias experimentales observadas con ratas y polluelos administrados de bases púricas, en-

tendemos que la variación de actividad de la xantindeshidrogenasa hepática pudiera ser consecuencia de un proceso de inducción enzimática dependiente de la cantidad de purina administrada.

Por otra parte, nosotros hemos observado (12), trabajando *in vitro* con homogenados hepáticos, en medio aerobio y en presencia de azul de metileno, que la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo, de rata y de leucocitos, resulta inhibida por un exceso de su propio sustrato, la xantina, análogamente a lo que ocurre con la xantinoxidasa de la leche (6) y a lo descrito por MORELL (9) para el enzima del pollo, en presencia de NAD. Este fenómeno podría ser el responsable de las aparentes contradicciones observadas en la actividad de la xantindeshidrogenasa de hígado al administrar purinas a mamíferos y aves.

Operando *in vitro* con homogenados de hígado de pollo, así como con purificados enzimáticos de xantindeshidrogenasa de

(*) Becario de la Comisaría de Protección Escolar.

la misma procedencia, hemos tratado de investigar la influencia de la concentración de varias bases púricas sobre la actividad del enzima, así como los efectos inducidos por la copresencia de algunas de dichas bases.

Se pensó que la actividad xantindeshidrogenásica podría también resultar afectada por la histamina, dado que la actividad de la xantinoxidasa de leche se exalta por la presencia de pequeñas cantidades de la amina (11) motivo por el cual también hemos efectuado este estudio.

Material y métodos

La xantindeshidrogenasa estudiada procedía de hígados de pollo. A partir de la víscera fresca se obtuvieron homogenizados por trituración de la glándula suspendida en tampón fosfatos de pH 7,4, 0,05 M, en la proporción de 1 g de parénquima hepático por cada 4 ml de disolución tampón, operando a unos 5° C.

Las diálisis de los homogenizados se practicaron a 5° C, mediante sacos de celofana, frente a tampón fosfato de las características indicadas, prolongándola durante 24 horas como mínimo.

Como preparado enzimático purificado se empleó el obtenido a partir de homogenizados según las técnicas de tratamiento térmico y de fraccionamiento con sulfato amónico previamente descritas por WESTERFELD (14) y adaptadas por CARRASCO y col. (2).

Los ensayos de incubación realizados para la determinación analítica de la actividad xantindeshidrogenásica se practicaron con muestras que, en un volumen total de 16 ml, contenían cantidades variables de tejido hepático, de tampón fosfato 0,05 M, de pH 7,4, de bases púricas y en todos los casos, 0,5 ml de disolución 0,01 M de azul de metileno. Se trabajó en medio aerobio haciendo burbujear oxígeno por las disoluciones y operando a la temperatura de $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

La acción enzimática se interrumpió por adición de 4 ml de ácido perclórico al 5 %, a los líquidos incubados. Las proteínas así precipitadas se separaron por filtración después de 15 minutos de reposo, y en los filtrados se determinó el ácido úrico presente por el método colorimétrico que emplea el reactivo de BROWN (1).

La determinación conjunta de xantina y de ácido úrico se efectuó colorimétricamente, mediante el reactivo de FOLIN (5). Los valores de xantina se obtuvieron por diferencia de los resultados colorimétricos obtenidos con ambos reactivos. Las respectivas densidades ópticas, $\lambda = 690 \text{ m}\mu$, se determinaron mediante un fotocolorímetro Spectronic 20.

Resultados

INHIBICIÓN DE LA XANTINDESHIDROGENASA POR LA XANTINA Y LA HIPOXANTINA.

Las muestras de incubación contenían 0,1 g de glándula hepática desintegrada mecánicamente en un volumen total de 16 ml y las cantidades de xantina o hipoxantina necesarias para que sus concentraciones estuviesen comprendidas entre $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $2 \times 10^{-3} \text{ M}$.

En las experiencias realizadas con preparado enzimático purificado la concentración en la muestra en incubación fue de 400 γ/ml . La actividad específica del producto utilizado era de 11,5 U.I.

Las incubaciones se realizaron en medio aerobio y en presencia de azul de metileno, utilizando tampón fosfatos 0,05 M, de pH 7,4.

Se determinaron las velocidades iniciales de formación de ácido úrico con diferentes concentraciones de sustrato. Los resultados obtenidos empleando homogenizado, y xantina o hipoxantina como sustratos, se expresan mediante gráficas $1/v$ frente a $1/S$. En la figura 1 aparece la correspondiente a la xantina.

En ambos casos se observa que cuando la concentración de la base, xantina o

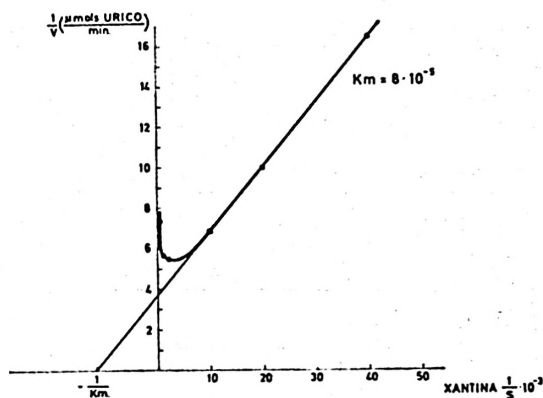


FIG. 1. Inhibición por la xantina de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo (homogenizado).

hipoxantina, es superior a 10^{-4} M, la velocidad de su transformación en ácido úrico disminuye, es decir, el exceso de sustrato inhibe a la xantindeshidrogenasa. Aplicando la expresión de LINEWEAVER-BURK (7), se ha calculado el valor de la K_m para el sistema xantina-xantindeshidrogenasa es: $K_m = 8 \times 10^{-5}$. El correspondiente valor para el sistema hipoxantina-xantindeshidrogenasa es: $K_m = 3,5 \times 10^{-5}$.

Trabajando con preparado purificado de la xantindeshidrogenasa hepática se han determinado también las velocidades iniciales, operando con concentraciones crecientes de la base púrica que actúa como sustrato, y expresando los resultados en las correspondientes gráficas de $1/v$ frente a $1/S$. La figura 2 corresponde a la transformación de hipoxantina en xantina, mostrando que la deshidrogenasa también es inhibida por el exceso de hipoxantina. Mediante la representación de Lineweaver-Burk se han determinado los correspondientes valores de K_m para la transformación de hipoxantina en xantina, $K_m = 6 \times 10^{-5}$, y el valor de la K_m aparente para la transformación de hipoxantina en ácido úrico, deducido de la correspondiente gráfica (fig. 3), que resulta ser: $K_m = 3,4 \times 10^{-5}$.

El correspondiente valor de K_m para la transformación de xantina en ácido

úrico, trabajando con el preparado enzimático purificado, es: $K_m = 3,1 \times 10^{-5}$ y puede deducirse de la figura 5 (véase más adelante).

El descenso observado en la producción de ácido úrico a partir de la hipoxantina, se debe a que el enzima la transforma previamente en xantina; téngase en cuenta que incubando hipoxantina 3×10^{-3} M durante 15 min. se alcanza una concentración de xantina $6,5 \times 10^{-5}$ M.

REVERSIBILIDAD DE LA INHIBICIÓN DE LA XANTINDESHIDROGENASA INDUCIDA POR SUS SUSTRATOS.

Con objeto de averiguar la posible recuperación de la actividad de la xantindeshidrogenasa inhibida por sus propios sustratos en exceso, se procedió del modo siguiente:

La disolución enzimática se adicionó de xantina o hipoxantina a concentraciones

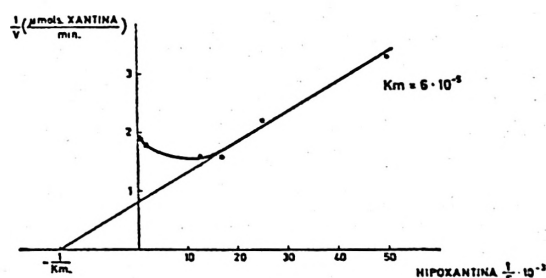


FIG. 2. Inhibición por la hipoxantina de la xantindeshidrogenasa (purificada).

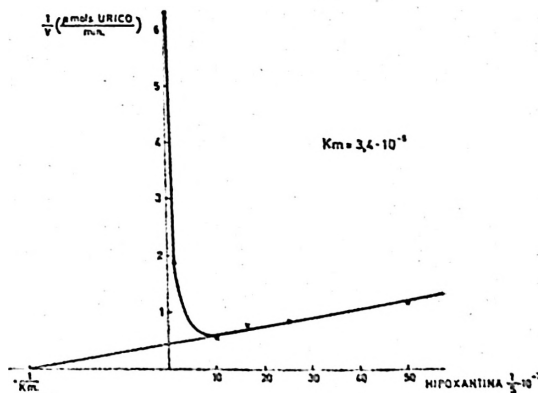


FIG. 3. Inhibición por la hipoxantina de la xantindeshidrogenasa (purificada).

TABLA I-A
Reversibilidad de la inhibición de la xantindeshidrogenasa por sus sustratos por diálisis.

TRATAMIENTO PREVIO CON XANTINA	URICO FORMADO FRENTE A (μ mol./ml. en 20 min.) $\cdot 10^2$		
	—	XANTINA $4 \cdot 10^{-5}$ M	XANTINA $8 \cdot 10^{-5}$ M
—	—	3.36	6.66
$5 \cdot 10^{-3}$ M	—	4.14	5.88
TIEMPO DE CONTACTO: 90 min.			
TRATAMIENTO PREVIO CON HIPOXANTINA	URICO FORMADO FRENTE A (μ mol./ml. en 20 min.) $\cdot 10^2$		
	—	HIPOXANTINA $5 \cdot 10^{-5}$ M	HIPOXANTINA $1 \cdot 10^{-4}$ M
—	—	3.78	7.66
$2 \cdot 10^{-3}$ M	—	4.08	7.24
TIEMPO DE CONTACTO: 210 min.			

productoras de inhibición, manteniendo el contacto enzima-sustrato durante intervalos de tiempo determinados, y posteriormente se eliminaron las bases púricas mediante una diálisis prolongada de las mezclas. En otra serie de experiencias se trató de comprobar si el enzima recuperaba su actividad al reducir, simplemente por dilución, la concentración de la base a valores inferiores a 10^{-4} M.

Las muestras que se sometieron a diálisis, o a dilución en su caso, contenían 0,5 g de hígado por cada 10 ml del tampón fosfato indicado, comparándose sus actividades enzimáticas con las de otras muestras que contenían además xantina e hipoxantina adicionadas, en las concentraciones respectivas que se indican en las tablas correspondientes.

El contacto previo entre el enzima y el sustrato se prolongó, en los distintos ensayos, de 1 a 24 horas, a temperaturas comprendidas entre $5-20^{\circ}$ C, antes de proceder a la diálisis frente a tampón o dilución de las muestras. La eliminación total de las purinas requirió diálisis prolongadas de hasta 60 horas. En los ensayos de dilución, la muestra tratada y la que se empleó como punto de referencia,

TABLA I-B
Reversibilidad de la inhibición de la xantindeshidrogenasa por sus sustratos al diluir.

TRATAMIENTO PREVIO CON XANTINA	DILUCION MUESTRA	URICO FORMADO FRENTE A (μ mols./ml. en 60 min.) $\cdot 10^2$	
		XANTINA $3,1 \cdot 10^{-5}$ M	XANTINA $6,25 \cdot 10^{-5}$ M
—	1: 50	—	1.32
—	1: 100	0.54	—
$5 \cdot 10^{-3}$ M	1: 50	—	1.32
$5 \cdot 10^{-3}$ M	1: 100	0.47	—
TIEMPO CONTACTO: 5 h. 30 min.			
TRATAMIENTO PREVIO CON HIPOXANTINA	DILUCION MUESTRA	URICO FORMADO FRENTE A (μ mols./ml. en 60 min.) $\cdot 10^2$	
		HIPOXANTINA $3,1 \cdot 10^{-5}$ M	HIPOXANTINA $6,25 \cdot 10^{-5}$ M
—	1: 50	—	0.43
—	1: 100	0.09	—
$5 \cdot 10^{-3}$ M	1: 50	—	0.48
$5 \cdot 10^{-3}$ M	1: 100	0.11	—
TIEMPO DE CONTACTO: 4 h.			

se diluyeron 50 ó 100 veces con tampón fosfato, determinándose las actividades enzimáticas del modo habitual. El período de incubación fue de 20 min. en los homogenados dializados, y de 60 min. para las muestras diluidas.

Los resultados obtenidos se resumen en las tablas I-A y I-B.

La observación de los valores consignados en ellas permite afirmar que la pérdida de actividad de la xantindeshidrogenasa provocada por el exceso de sus

propios sustratos, xantina o hipoxantina, puede recuperarse al eliminar dicho exceso mediante diálisis o por disminuir la concentración por dilución, de modo que la cantidad de base púrica en la incubación sea inferior a 10^{-4} M.

La disminución de la actividad enzimática debida al exceso de sustrato se manifiesta de modo inmediato al mezclar xantina o hipoxantina con el enzima, a temperaturas comprendidas entre 5 y 20° C. Sin embargo, el contacto prolongado entre el enzima y el sustrato no debe introducir alteración alguna en la estructura de la proteína, puesto que el enzima recupera prácticamente toda su actividad catalítica tanto al eliminar el sustrato como al reducir su concentración.

ACCIÓN DE MEZCLAS DE XANTINA E HIPOXANTINA SOBRE LA ACTIVIDAD XANTINDESHIDROGENÁSICA.

Con el fin de investigar el posible significado fisiológico del efecto que la concurrencia de ambas bases púricas pudiera inducir sobre la actividad de la xan-

tinدهydrogenasa, se ha estudiado la actuación del enzima *in vitro* sobre mezclas de ambos sustratos, utilizando proporciones variables y operando durante diversos intervalos de tiempo.

a) Influencia de la concentración de bases púricas.

Las muestras a incubar contenían 0,08 g de parénquima hepático triturado, disperso en un volumen total de 16 ml, practicándose la incubación en las condiciones habituales.

Los resultados aparecen reunidos en la tabla II.

Las cantidades de ácido úrico producidas cuando el enzima actúa por separado sobre cada una de las bases púricas es mayor que cuando actúa simultáneamente sobre ambas. Se observa que la disminución en la producción es muy considerable cuando la concentración de ambas bases es superior a 10^{-4} M.

El descenso en la producción de ácido úrico se hace más patente al ir aumentando la concentración de la hipoxantina presente, observándose entonces que se

TABLA II
Incubación de mezclas xantina e hipoxantina. Formación de ácido úrico.

HOMOGENADO Nº	CONCENTRACIONES MOLARES DE LAS BASES PURICAS		URICO FORMADO ($\frac{\mu\text{mols}}{\text{ml.}} \text{ en } 20\text{min}$) $\cdot 10^2$	DECREMENTOS DE URICO (%) *
	XANTINA	HIPOXANTINA		
1	$2.5 \cdot 10^{-5}$	—	1.80	—
	—	$5 \cdot 10^{-5}$	3.80	
	$2.5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	5.40	
2	$1 \cdot 10^{-4}$	—	9.60	28
	—	$5 \cdot 10^{-5}$	3.80	
	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-5}$	9.60	
3	$5 \cdot 10^{-4}$	—	13.20	40
	—	$5 \cdot 10^{-4}$	1.80	
	$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	9.00	
	$1 \cdot 10^{-3}$	—	13.20	50
	—	$1 \cdot 10^{-3}$	0.60	
	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	6.80	

* % decremento respecto a las cantidades producidas separadamente por las bases.
Concentración en tejido hepático: 5 mg/ml.

produce una notable acumulación de xantina, tal como muestra la tabla III.

b) *Producción de ácido úrico a diversos intervalos de tiempo.*

La deshidrogenación de las mezclas de hipoxantina y xantina, catalizada por el enzima que nos ocupa, se estudió a diversos intervalos de tiempo. La tabla IV recoge los resultados experimentales obtenidos.

En ella puede observarse cómo la presencia de hipoxantina hace disminuir la

magnitud de la transformación de la xantina en ácido úrico, al par que produce un aumento de la concentración de la propia xantina a costa de la hipoxantina desaparecida en un primer estadio de su deshidrogenación.

Esta acumulación provisional de xantina, que tiene lugar al principio, va desapareciendo al prolongarse el intervalo de incubación. De hecho, parece deducirse que en las condiciones experimentales descritas (incubación aerobia en presencia de azul de metileno), la transformación de la hipoxantina en xantina

TABLA III
Incubación de mezclas de xantina e hipoxantina. Efecto del incremento de la concentración de hipoxantina.

CONCENTRACION MOLAR EN HIPOXANTINA	$\Delta \mu \text{ mols. XANTINA}$ POR mL. ($\cdot 10^2$)	$\Delta \mu \text{ mols A. URICO}$ POR mL. ($\cdot 10^2$)
—	-6.36	+6.03
$5 \cdot 10^{-5}$	-4.28	+5.78
$1 \cdot 10^{-4}$	-2.03	+5.36
$5 \cdot 10^{-4}$	+4.20	+2.58
$1 \cdot 10^{-3}$	+6.44	+0.86

Xantina inicial : $0.10 \mu \text{ mols/ml.}$
Tiempo de incubación : 10 minutos.

Temperatura : $30^\circ \text{ C} \pm 0.1.$
Concentración en tejido hepático : 0.03 g/ml.

TABLA IV
Incubación de mezclas de xantina e hipoxantina. Tiempos crecientes de incubación

BASE PURICA INICIAL	XANTINA $\Delta \mu \text{ mols./ml. } (\cdot 10)$					ACIDO URICO $\Delta \mu \text{ mols./ml. } (\cdot 10)$					
	TIEMPO (MIN.)	0	6	15	60	120	0	6	15	60	120
XANTINA $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$		-	-1.17	-1.13	-1.52	-1.52	-	+1.20	+1.23	+1.82	+1.82
HIPOXANTINA $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$		-	+1.24	+1.88	+1.87	+0.17	-	+0.20	+0.88	+4.71	+8.61
XANTINA $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ HIPOXANTINA $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$		-	+1.27	+1.45	+1.09	0.00	-	+0.37	+1.04	+5.25	+8.09

Concentración en tejido hepático : 5 mg/ml.

es una reacción preferente a la conversión de esta última base en ácido úrico. Nuestros resultados se corresponden con las observaciones de otros autores (8), quienes reconocen que cuando la incubación aerobia de la hipoxantina en presencia de azul de metileno se prolonga durante intervalos de tiempo prolongados no se acusa acumulación alguna de xantina.

Se observa también que en las incubaciones practicadas a tiempos limitados, de 6 a 15 min., la suma del ácido úrico producido por las mezclas de xantina y de hipoxantina es inferior a la suma de las que forman ambas bases incubadas por separado, mientras que aumenta la concentración de la xantina producida por oxidación de la hipoxantina.

Estos fenómenos están en concordancia con los respectivos potenciales redox de los sistemas hipoxantina-xantina y xantina-ácido úrico (10), que son, respectivamente $E_o = -407$ mV, y $E_o = -355$ mV; se comprende, por tanto, que la acción deshidrogenante catalizada por el enzima se efectúe preferentemente sobre la hipoxantina, con la consiguiente acumulación de xantina, y que solamente, cuando la concentración de la primera base ha disminuido lo suficiente, es cuando la transformación de la xantina en ácido úrico se manifiesta como cuantitativamente importante.

ACCIÓN DE LOS HOMOGENADOS HEPÁTICOS SOBRE LA ADENINA Y LA ADENOSINA.

Se incubaron homogenados de hígado de pollo adicionados de adenina en concentraciones comprendidas entre 5×10^{-5} y 4×10^{-3} M, operando en medio aerobio, en presencia de azul de metileno, a la temperatura de $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$, y a pH 7,4 (tampón fosfatos 0,05 M). El intervalo de incubación utilizado fue de 60 min. Los resultados experimentales aparecen en la figura 4. Se observa que esta base constituye un buen sustrato para los sis-

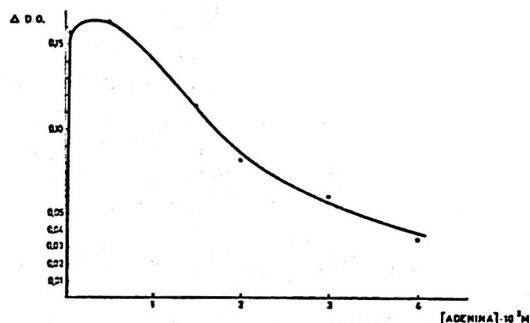


FIG. 4. Inhibición de la producción de ácido úrico por exceso de adenina.

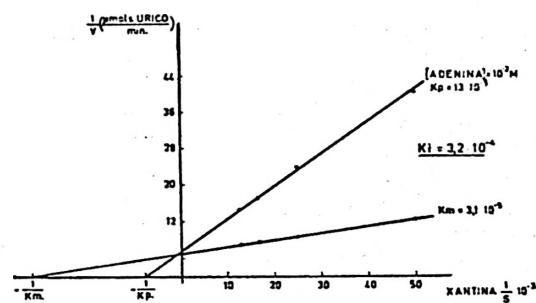


FIG. 5. Inhibición de la xantindeshidrogenasa por adenina.

temas enzimáticos presentes en el homogenado hepático, pero cuando la concentración de adenina es superior a 10^{-4} M, la cantidad de ácido úrico producida disminuye progresivamente.

Por otra parte, la presencia de adenina ha mostrado inhibir la transformación de la xantina en ácido úrico, cuando se emplean purificados enzimáticos como fuente de deshidrogenasa. Los resultados aparecen en la figura 5.

El proceso puede consignarse mediante la representación de Lineweaver-Burk (loc. cit.), la cual pone de relieve que la adenina se comporta como inhibidor competitivo de la transformación de xantina en ácido úrico. Los correspondientes valores de K_m y K_i obtenidos, son los siguientes: xantina-ácido úrico-xantindeshidrogenasa $K_m = 3,1 \times 10^{-5}$; para el sistema en presencia de adenina $K_i = 3,2 \times 10^{-4}$.

La adenosina se transforma en ácido úrico por acción de los homogenados hepáticos de pollo, pero cuando la concentración del nucleósido es superior a 10^{-4} M, se aprecia que decrece la cantidad de ácido úrico producido, de modo análogo a lo observado con la adenina base. El nucleósido, sin embargo, no ejerce acción inhibitoria alguna sobre la transformación de xantina a ácido úrico cuando se ensaya (10^{-4} M) sobre un homogenado hepático o un preparado purificado de xantindeshidrogenasa.

ACCIÓN DE LA HISTAMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA XANTINDESHIDROGENASA.

La potente acción farmacológica de la histamina y el hecho de haberse afirmado que anula la inhibición de la xantinoxidasa de leche ejercida por un exceso de sus sustratos, xantina o hipoxantina (11), nos indujo a ensayar su acción sobre el sistema xantindeshidrogenásico del hígado de pollo presente en los homogenados. La incubación se llevó a cabo en las condiciones habituales y las muestras contenían 0,08 g de tejido hepático.

La tabla V reúne los diversos valores obtenidos.

La histamina se comporta como inhibidor de la xantindeshidrogenasa hepática, tanto cuando el sustrato es xantina como cuando es hipoxantina.

Experiencias realizadas incubando aeróbicamente, pero sin azul de metileno,

TABLA V
Inhibición de la xantindeshidrogenasa por la histamina.

[HISTAMINA] M	% INHIBICION FRENTE A		
	XANTINA 10^{-4} M 10^{-3} M		HIPOXANTINA 10^{-3} M
$5 \cdot 10^{-5}$	NO	NO	NO
10^{-4}	NO	NO	—
$5 \cdot 10^{-4}$	20	10	—
$5 \cdot 10^{-3}$	80	50	25
10^{-2}	—	—	43

mostraron también que la histamina inhibe la acción pseudoxidásica del homogenado de hígado de pollo, actuando sobre ambas bases púricas. Los porcentajes de inhibición obtenidos son análogos a los anteriormente expuestos.

ACCIÓN NULA DEL ÁCIDO ÚRICO DE LA INOSINA.

En la incubación aerobia en presencia de azul de metileno de homogenados de hígado de pollo que contenían xantina (10^{-4} M) o hipoxantina (5×10^{-4} M) como sustratos y a los que se adicionó ácido úrico (1 a 5×10^{-4} M) no se observó reducción alguna en la producción normal del mismo.

Trabajando con homogenados hepáticos de pollo dializados y con preparado enzimático purificado de la xantindeshidrogenasa, el nucleósido inosina (10^{-4} M) no mostró ejercer acción inhibitoria alguna sobre la producción de ácido úrico a partir de xantina.

Discusión

El fenómeno, observado por nosotros, de la inhibición *in vitro* de la xantindeshidrogenasa hepática de pollo provocada cuando sus sustratos, la xantina o la hipoxantina, se hallan presentes en concentraciones superiores a 10^{-4} M, puede tener una significación fisiológica cuantitativa por lo que se refiere a la transformación *in vivo* de ambas bases púricas en ácido úrico, así como el hecho de que la adenina también inhiba la deshidrogenación enzimática de la xantina.

La inhibición de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo, provocada por excesos de xantina o de hipoxantina, es reversible. En efecto, hemos podido demostrar que el enzima inhibido, por haber sido mantenido en contacto previo, durante varias horas, con un exceso de alguna de las bases púricas, xantina o hipoxantina, recupera su actividad total al eliminar dichos sustratos por diálisis

o por dilución, hasta reducir su concentración a valores iguales o inferiores a 1×10^{-4} M.

Estos efectos descritos en el presente trabajo, que afectan notablemente a la cantidad de ácido úrico formada cuando se trabaja *in vitro*, pudieran contribuir a explicar los contradictorios resultados obtenidos *in vivo* por diversos autores (3, 4, 13), respecto de las modificaciones del nivel de la xantindeshidrogenasa hepática, cuando se administran bases púricas a aves o a mamíferos. Como quiera que la concentración normal de xantina en el hígado de pollo es ya del orden de 10^{-4} M, según hubimos determinado previamente (12), cualquier variación de nivel o de concentración de base púrica en la glándula pudiera provocar una modificación de la cantidad de ácido úrico formada.

Es decir, que las mencionadas variaciones no creemos deban imputarse exclusivamente a modificación de las cantidades de xantindeshidrogenasa presentes, ya que según hemos podido establecer, midiendo la conversión de la hipoxantina en ácido úrico, cuando se trabaja con concentraciones de aquélla superiores a 10^{-4} M (condiciones que provocan inhibición por sustrato), la base púrica se transforma, en primer lugar, en xantina, cuya ulterior deshidrogenación a ácido úrico resulta retardada por el propio exceso de hipoxantina presente; a la interpretación de este fenómeno pueden también contribuir los distintos valores de los potenciales de electrodo de las respectivas óxido-reducciones: hipoxantina-xantina ($E_0 = -407$ mV), y xantina-ácido úrico ($E_0 = -355$ mV); que hacen de la hipoxantina el sustrato preferente de la deshidrogenación enzimática.

En la actuación simultánea de la xantindeshidrogenasa sobre mezclas de hipoxantina y de xantina, resulta claro que la cantidad de ácido úrico formada a partir de la mezcla de ambas bases es menor que la suma de las que se obtienen

al actuar el enzima, por separado, sobre cada una de ellas; la producción de ácido úrico disminuye al aumentar la concentración de la hipoxantina presente. En todos los casos la xantindeshidrogenasa transforma la hipoxantina en xantina, la cual, primeramente, se acumula, pero va desapareciendo (pasando a ácido úrico) al prolongarse el tiempo de actuación del enzima.

De lo anteriormente expuesto puede deducirse que cuando la xantindeshidrogenasa actúa sobre varias bases púricas simultáneamente, tal como podría ocurrir *in vivo* en la glándula hepática *in situ* de un animal entero, las diversas transformaciones experimentadas se hallarán condicionadas mutuamente por las respectivas concentraciones de las bases presentes. En estos casos, la actividad xantindeshidrogenásica medida por determinación analítica del ácido úrico producido proporcionaría unos valores (inferiores) que no corresponderían a la cantidad de enzima realmente presente en el tejido hepático investigado.

Las diversas acciones ejercidas por la xantina, la hipoxantina y la adenina sobre la xantindeshidrogenasa hepática de pollo, pueden constituir aspectos parciales de un posible mecanismo fisiológico de auto-regulación enzimática en la producción de ácido úrico.

Resumen

La xantindeshidrogenasa de hígado de pollo es inhibida por exceso de sus sustratos xantina e hipoxantina. El fenómeno comienza a manifestarse cuando el nivel del sustrato es de 10^{-4} M, aumentando considerablemente la inhibición si las concentraciones de las bases púricas son superiores. Se ha comprobado que la inhibición es reversible tanto por eliminación de las bases púricas por diálisis, como por simple dilución de las disoluciones.

La introducción de hipoxantina 5×10^{-4} M en el sistema xantina (5×10^{-4} M)-xantindeshidrogenasa provoca un descenso en la producción de ácido úrico del 40 %, cuando la incu-

bación se realiza en un período de 20 min.; en estas condiciones se acumula en el medio cierta cantidad de xantina, como resultado de la deshidrogenación inicial de la hipoxantina. Si los períodos de incubación son más prolongados (60 min.) el nivel de xantina tiende a disminuir, dando por resultado un incremento en la formación de ácido úrico.

La adenina inhibe la transformación de la xantina en ácido úrico y esta inhibición es de naturaleza competitiva. La propia adenina se transforma en ácido úrico por acción de los homogenados hepáticos de pollo, pero cuando la concentración del sustrato es superior a 10^{-4} M, se observa un descenso en la producción de ácido úrico. La adenosina, la inosina y el ácido úrico no interfieren con la deshidrogenación enzimática de la xantina. Por otra parte, la histamina 5×10^{-3} M, inhibe la actividad de la xantinedehidrogenasa. Estas observaciones creemos pueden contribuir a dar una interpretación de la regulación fisiológica de producción de ácido úrico que tiene lugar en la glándula hepática *in situ*.

Summary

On the formation of uric acid by hepatic xanthinedehydrogenase

An excessive concentration of xanthinedehydrogenase substrates, such as xanthine or hypoxanthine, inhibits *in vitro* the activity of the chicken liver enzyme. This phenomenon first appears when the substrate level is above 1×10^{-4} M, but increases considerably with higher concentrations of the base. The reversibility of the inhibition has been proved either by removal of the purines by dialysis, or simply by diluting the solutions.

When 5×10^{-4} M hypoxanthine is introduced into a 5×10^{-4} M xanthine-xanthinedehydrogenase system, a decrease of about 40 % in the normal uric acid production is observed, provided a short period of incubation time — 20 minutes — is taken into consideration: a certain amount of xanthine accumulates then in the medium, the result of an initial dehydrogenation of hypoxanthine. However, if the incubation period is lon-

ger — 60 minutes — the xanthine level tends to decrease and a correspondingly greater uric acid formation takes place.

Adenine appears to inhibit the enzymatic conversion of xanthine into uric acid, the action being of a competitive character. Adenine itself is converted into uric acid by liver homogenates, but when the substrate concentration exceeds 1×10^{-4} M, a decrease in the uric acid formation is observed. Adenosine, inosine and uric acid, do not seem to interfere with the enzymatic dehydrogenation of xanthine. On the other hand, 5×10^{-3} M histamine inhibits the activity of the xanthinedehydrogenase.

These observations, we believe, may contribute to an interpretation of the physiological regulation of the uric acid production that takes place in the hepatic gland *in situ*.

Bibliografía

1. BROWN, H., et al.: *J. Biol. Chem.*, **158**, 602, 1945.
2. CARRASCO, E., MARTÍN-ESTEVE, J., y CALVET, F.: Comunicación personal.
3. DIETRICH, L. S.: *J. Biol. Chem.*, **211**, 79, 1954.
4. FRIGELSON, P., et al.: *Science*, **120**, 502, 1954.
5. FOLIN, O., et al.: *J. Biol. Chem.*, **73**, 627, 1927.
6. HOFSTER, B. H. J.: *Biol. Chem.*, **216**, 235, 1955.
7. LINEWEAVER, H., and BURK, D.: *J. Am. Chem.*, **56**, 658, 1934.
8. MARÍN, A., MARTÍN-ESTEVE, J., y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **20**, 165, 1964.
9. MORELL, D. B.: *Biochim. et Biophys. Acta*, **18**, 221, 1955.
10. MORELL, D. B.: *Biochem. J. Proceedings*, **51**, 657, 1952.
11. MURAOKA, S.: *Biochim. et Biophys. Acta*, **73**, 17, 1963.
12. RAMA, J., BOZAL, J., y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **22**, 85, 1966.
13. STIRPE, F., and DELLA CORTE, E.: *Biochem. J.*, **94**, 309, 1965.
14. WESTERFELD, W.: *J. Biol. Chem.*, **199**, 398, 1952.