

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Barcelona

## Xantindeshidrogenasa hepática I. Purificación y propiedades de la humana y de la porcina

por

E. Carrasco, J. Martín-Esteve y F. Calvet

(Recibido para publicar el 14 de mayo de 1968)

La estrecha relación que parece existir entre el funcionalismo de la xantindeshidrogenasa hepática y los dismetabolismos uricogénicos de las enfermedades gotosas (6, 13, 14, 16), nos ha impulsado a realizar los ensayos que a continuación se describen.

Partiendo de glándulas hepáticas de hombre y de cerdo, se han desarrollado métodos de preparación de los correspondientes enzimas lo suficientemente purificados para poderlos utilizar en la investigación de algunas reacciones enzimáticas que puede contribuir al esclarecimiento de los mecanismos reguladores de la bioproducción del ácido úrico.

Algunos autores (9, 12) consiguieron purificar la xantinoxidasa de la leche utilizando técnicas diversas, hasta que en 1955, AVIS logró aislarla en forma cristalizada (1). También se realizaron profusos estudios de purificación de la xantindeshidrogenasa hepática por parte de REMY y WESTERFELD (17), quienes utilizando hígado de pollo consiguieron purificar y concentrar el enzima hasta unas

400 veces. Más recientemente, LANDON y CARTER (11), describieron la purificación de la deshidrogenasa del riñón de pollo, empleando técnicas semejantes a las utilizadas por los autores antes citados, pero intercalando una cromatografía con DEAE-celulosa.

CORRAN operó con hígado de cerdo (4) y RICHERT y col. (18) purificaron la xantindeshidrogenasa hepática de cerdo y de rata, mediante técnicas de precipitación selectiva con sulfato amónico, desnaturalización térmica, tratamientos con enzimas proteolíticos y adsorciones con geles de fosfato cálcico o celulosa, logrando así un preparado altamente purificado.

En las técnicas de purificación adoptadas por nosotros para la obtención de preparados de xantindeshidrogenasa hepática de pollo y de mamífero, con el objeto de no implicar factores que pudieran modificar las actividades enzimáticas, hemos evitado el uso de métodos posiblemente desnaturizantes, tales como tratamientos térmicos prolongados, o por álcalis.

Diversos autores descubrieron la exis-

tencia de una correlación entre las actividades enzimáticas específicas de los preparados de xantindeshidrogenasa y sus espectros de absorción: en verdad se puede juzgar cuantitativamente del proceso progresivo de una purificación por medición de las relaciones de absorbancias entre 280  $m\mu$  y 450  $m\mu$  de los sucesivos preparados (1, 4, 12). Los valores de estas relaciones disminuyen al aumentar la concentración enzimática del producto purificado. Estas observaciones nos han sido de utilidad durante el estudio de las técnicas de purificación desarrolladas por nosotros.

### Material y métodos

Los hígados de cerdo utilizados en este trabajo fueron congelados inmediatamente después del sacrificio de los animales; las glándulas hepáticas humanas procedentes de víctimas de accidentes de tráfico, también se congelaron lo antes posible, una vez se pudo disponer de ellas.

Se emplearon xantina, ácido úrico, azul de metileno y colchicina de la casa Merck; la fenilbutazona era de calidad farmacéutica y fue recristalizada por nosotros dos veces en alcohol de 70°; p.f. = 103-5°.

Para las separaciones cromatográficas se dispuso de DEAE-celulosa y CM-celulosa de la casa Brown, y DEAE-sefadex A-25 de Pharmacia Fine Chemicals Inc. Las electroforesis se realizaron sobre tiras de poliacetato de celulosa gelatinizado, celogel, suministradas por Chemetron.

La tripsina cristalizada y liofilizada fue obtenida por nosotros a partir de páncreas vacuno.

**HOMOGENADOS.** Una cantidad pesada de tejido hepático fresco procedente del animal recién sacrificado o congelado, se homogenizó manualmente mediante un homogenizador de Potter, corrientemente, con cinco veces su peso de tampón fosfato 0,05 M de pH 7,4.

**CONCENTRACIONES PROTEICAS.** Para su determinación se empleó el método colo-

rimétrico del biuret (7). Cuando se trataba de establecer las concentraciones en proteínas de eluidos cromatográficos, se determinó simplemente la extinción de las disoluciones a 280  $m\mu$ .

**CONCENTRACIONES DE ÁCIDO ÚRICO.** Se ha utilizado el método colorimétrico de BROWN (2).

**CONTENIDOS EN XANTINA.** Se aplicó el método espectrofotométrico diferencial de KALCKAR (10), adaptado a su empleo en los homogenados hepáticos.

**ACTIVIDADES XANTINDESHIDROGENÁSICAS Y OXIDÁSICAS.** Las determinaciones de actividades de los homogenados hepáticos o de los preparados purificados del enzima se llevaron a cabo de acuerdo con la siguiente técnica: en sendos matraces de 25 ml provistos de dos tubos abductores dispuestos para la entrada y salida de gases — aire u oxígeno —, situados en un termostato a 30°, se introducen volúmenes adecuados de disoluciones de xantina en tampón fosfato 0,05 M de pH 7,4 que proporcionen una concentración de  $5 \times 10^{-5}$  M de la base en el volumen global a incubar, y una disolución de azul de metileno para asegurar una concentración final de  $3,1 \times 10^{-4}$  M, esto último cuando hay que determinar la actividad deshidrogenásica; si se desea establecer actividades oxidásicas, se prescinde de la adición del colorante. Entonces se incorpora la disolución enzimática al contenido de los recipientes, con lo que se inician las incubaciones. Manteniendo una lenta circulación de aire, se extraen porciones alícuotas de 4 ml de las mezclas a distintos intervalos de tiempo (0, 5, 10, 15 y 20 minutos), las cuales se vierten separadamente sobre sendos 1 ml de ácido perclórico al 5%. Pasados 20 minutos de reposo, las mezclas se filtran y en las disoluciones transparentes resultantes se determina el ácido úrico formado por el método colorimétrico de BROWN.

**ACTIVIDADES URICÁSICAS.** En cada uno de los tubos de incubación de 25 ml de capacidad se introduce una disolución

de ácido úrico en tampón borato 0,2 M de pH 8,5, para asegurar una concentración final de  $7,5 \times 10^{-5}$  M. Seguidamente se incorpora la disolución enzimática (generalmente 3,5 ml de homogenado por 21 ml de líquido total de incubación), con lo que comienza la reacción. Manteniendo el conjunto a 30° y con la agitación continua de un suave burbujeo de oxígeno, se extraen, a los tiempos de 1, 3, 5, 7 y 9 minutos, volúmenes parciales de 4 ml que se vierten en sendos tubos que contienen 1 ml de ácido perclórico al 5% cada uno. Después de 20 minutos, los líquidos se filtran y se determina en ellos la concentración de ácido úrico por el método de Brown.

### Resultados

#### ACTIVIDADES XANTINDESHIDROGENÁSICAS Y URICÁSICAS DE DISTINTAS FRACCIONES CELULARES.

Para la separación de las fracciones celulares de homogenados de hígado huma-

no y de cerdo se ha utilizado el método de centrifugación diferencial (8).

Los tejidos hepáticos — 2 g — se homogenizaron manualmente en un Potter-Elvehjem con sacarosa 0,25 M (1/100, peso/volumen) a 0-4°. Los homogenados se filtraron por franela y el líquido resultante se centrifugó a 700 g durante 10 minutos, con lo que sedimentó una fracción constituida por los núcleos. Estos se lavaron suspendiéndolos en una disolución de sacarosa-Cl<sub>2</sub>Ca, y se recuperaron por nueva centrifugación. Del sobrenadante anterior se separaron las fracciones mitocondrial, centrifugándolo a 5.000 g durante 10 minutos y finalmente la microsómica, a 30.000 g durante 2 horas. Por último, se practicó un balance de actividades xantindeshidrogenásicas y uricásicas (cerdo), determinando las de cada una de las fracciones sedimentadas, convenientemente suspendidas en un volumen de tampón idéntico al volumen original del homogenado de partida; de esta forma se consiguen unas suspensiones cuyas concen-

TABLA I  
Localización de la xantindeshidrogenasa y de la uricasa\* en distintas fracciones celulares obtenidas por centrifugación diferencial

Fracción analizada	Actividades enzimáticas		
	Porcino		Humano
	Xantindeshidrogenasa U	Uricasa U	Xantindeshidrogenasa U
Homogenado de partida	$1,06 \times 10^{-2}$	$2,10 \times 10^{-2}$	$1,37 \times 10^{-2}$
Fracción nuclear	0,0	0,0	$0,24 \times 10^{-2}$
Fracción mitocondrial	0,0	$2,73 \times 10^{-2}$	0,0
Fracción microsomal	0,0	0,0	0,0
Sobrenadante	$1,05 \times 10^{-2}$	0,0	$0,94 \times 10^{-2}$

\* El valor de la actividad uricásica de la fracción mitocondrial es aparentemente superior al del homogenado de partida del hígado porcino, debido a que éste posee un contenido en xantina lo suficientemente elevado para que su actividad uricásica se encuentre parcialmente inhibida (*ver texto*). La purina se recupera totalmente en el sobrenadante.

TABLA II  
Exaltación de las actividades enzimáticas de los homogenados sometidos a diálisis

Preparados hepáticos de cerdo	Actividad xantindeshidrogenásica U	Actividad xantinoxidásica U	Actividad uricásica U
Homogenado sin dializar	2,60	1,00	0,00
Homogenado dializado	2,82	1,86	0,60
Homogenado dializado aguas de <sup>+</sup> diálisis	2,40	1,52	0,16

traciones en partículas celulares, equivalen separadamente, a la del homogenado de partida, así como a la del sobrenadante final (tabla I).

LA XANTINA COMO INHIBIDOR NATURAL DE LAS ACTIVIDADES XANTINDESHIDROGENÁSICA, XANTINOXIDÁSICA Y URICÁSICA.

Se observó que las actividades xantindeshidrogenásica, xantinoxidásica y uricásica del hígado fresco de cerdo tendían a aumentar a medida que la glándula envejecía por conservación en la nevera a 4°, obteniéndose un efecto análogo si los homogenados frescos se sometían a una diálisis previa. En este último caso se apreciaba (tabla II) un incremento de las actividades enzimáticas, mientras que la reincorporación de las aguas de diálisis provocaba una marcada disminución de la uricolisis.

Los homogenados utilizados se prepararon en tampón fosfato 0,05 M y su concentración fue de 1/5, peso/volumen.

El fenómeno de exaltación enzimática se atribuyó a la eliminación por la diálisis de algún inhibidor de las citadas actividades enzimáticas de los homogenados.

Por incorporación de EDTA a las aguas de diálisis se pudo comprobar que el efec-

to inhibitor observado no era atribuible a la presencia de metales pasados.

Posteriormente se investigó en las aguas de diálisis la presencia de xantina (conocido inhibidor de las actividades uricásica (15) y xantindeshidrogenásica (16), incubándolas con xantinoxidasa de la leche: la gran cantidad de ácido úrico producido (1,3 micromoles de úrico/g de glándula hepática dializada) confirmó la existencia de la base en concentraciones sustanciales. Y en efecto, las aguas de diálisis que habían sido tratadas por xantinoxidasa de la leche — desaparición de la xantina — no provocaron efecto inhibitor sensible de la uricasa al incorporarlas al homogenado dializado (no se pudo efectuar un ensayo paralelo de la actividad xantindeshidrogenásica debido a la interferencia ejercida por la copresencia en el líquido de la xantinoxidasa láctea).

CONCENTRACIÓN FISIOLÓGICA DE XANTINA DEL HÍGADO DE ALGUNOS ANIMALES.

Para determinar los niveles fisiológicos de xantina de distintas glándulas hepáticas se prepararon sendos homogenados de los correspondientes hígados [en tampón fosfato pH 7,4 (1/5, peso/vol.)] y se comenzó por eliminarles las proteínas presentes

por defecación con ácido perclórico. En una parte alícuota del líquido filtrado neutralizado hasta pH 7,4, se establecieron las concentraciones de xantina, utilizando el método espectrofotométrico de KALCKAR (10): los valores hallados expresados en moles de purina por kilo de tejido fresco fueron los siguientes: hígado de pollo  $3 \times 10^{-4}$ , de cobaya  $3 \times 10^{-4}$ , de rata  $2 \times 10^{-3}$ , de cerdo  $1,5 \times 10^{-3}$  y de hombre  $1,9 \times 10^{-3}$ .

#### PURIFICACIÓN DE LA XANTINDESHIDROGENASA DE HÍGADO HUMANO.

Se homogenizaron 1.000 g de glándula con 5 litros de tampón fosfato 0,05 M, de pH 7,4, procediéndose a precipitar fraccionadamente las proteínas solubles mediante concentraciones crecientes de sulfato amónico. Los sucesivos precipitados formados se separaron por centrifugación. La mayor parte de la actividad xantindeshidrogenásica aparece concentrada en la fracción recogida entre 0,3 y 0,6 saturación de la sal. Una parte de 12,5 g de este precipitado proteico se disolvió en 20 ml de tampón fosfato 0,05 M de pH 7,4 y

TABLA III  
Purificación de la xantindeshidrogenasa de hígado humano.

Preparado enzimático	Actividad específica $U \times 10^{-4} / \text{mg. proteína}$	Grado de purificación
Homogenado inicial	0,094	—
Fracción 0,3-0,6 saturación en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,50	5,0 veces
Fracción eluida n° 138	6,12	65,1 veces

la disolución se sometió a diálisis frente a agua destilada durante 15 horas a  $4^\circ$ , hasta reacción negativa del ion sulfato. Los dializados se centrifugaron a 3.300 g durante 10 minutos para clarificarlos y con los sobrenadantes se alimentó una columna cargada con DEAE-celulosa, previamente lavada y equilibrada con tampón fosfato 0,001 M, pH 7,4.

Seguidamente se inició la cromatografía

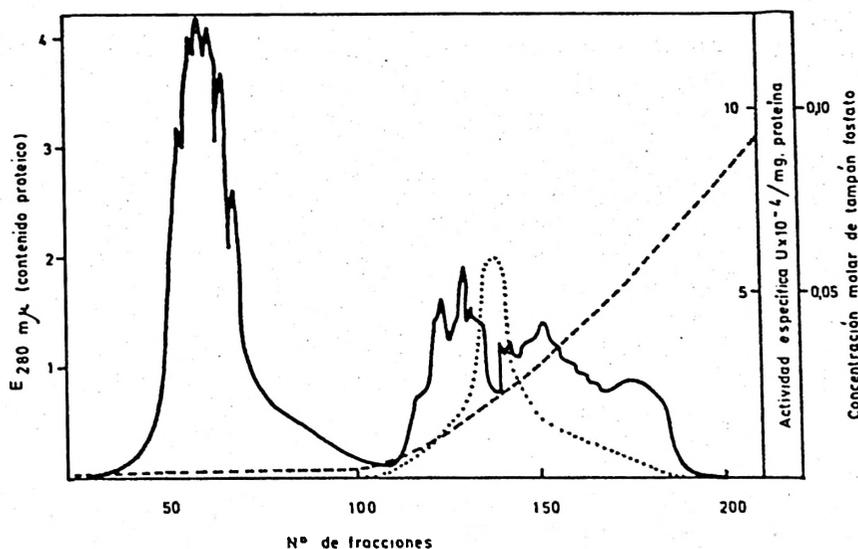


FIG. 1. Cromatografía con DEAE-Celulosa del preparado enzimático de hígado humano. (—) Contenido en proteínas ( $E_{280 \text{ m}\mu}$ ); (...) Curva de actividades enzimáticas específicas (U/mg proteína); (- - -) Curva de concentraciones del eluyente (tampón fosfato pH 7,4).

a temperaturas comprendidas entre 0 y 4° — cámara frigorífica —, eluyendo primero con 400 ml de tampón fosfato 0,001 M, pH 7,4 y después mediante un gradiente de concentraciones salinas crecientes, conseguido al mezclar gradualmente 400 ml de tampón fosfato 0,001 M con 200 ml de tampón fosfato 0,1 M. La velocidad de elución fue de unos 0,5 ml/minuto y se recogieron 200 fracciones (fig. 1) de unos 5 ml cada una.

La fracción eluida de mayor actividad xantindeshidrogenásica fue la n.º 138, que dotada de una actividad específica igual a  $6 \times 10^{-4}$  U/mg representa una concentración unas 65 veces superior al homogenado de partida (tabla III).

Con el enzima purificado recogido en la fracción n.º 138 (tabla III) se realizó un estudio espectrofotométrico en las zonas ultravioleta y visible, cuya representación aparece en la figura 3 (véase más adelante).

#### PURIFICACIÓN DE LA XANTINDESHIDROGENASA DE HÍGADO PORCINO.

Después de algunos ensayos de orientación previos, practicados utilizando técnicas de desnaturalización térmica, tratamientos con enzimas proteolíticos y cromatografía con sustancias intercambiadoras de iones, para la purificación del enzima hepático de cerdo, adoptamos el siguiente método: 720 g de hígado del suido recién sacrificado o congelado se homogenizaron con 3,6 litros de tampón fosfato 0,05 M de pH 7,4. El homogenado se centrifugó a 3.300 g durante 10 minutos y el líquido sobrenadante se fraccionó con sulfato amónico recogiendo por centrifugación la fracción precipitada entre 0,3 y 0,6 saturación. El precipitado de proteínas se disolvió en 2 litros de agua destilada y se precipitó de nuevo con la misma concentración salina. Cuarenta gramos del precipitado húmedo obtenido se disolvieron en 400 ml de tampón fosfato, se adicionaron 78 mg de tripsina y se incubaron a 38° durante 3 horas. Seguidamente se calentó la disolución a 60° du-

rante 5 minutos y se enfrió rápidamente a 0°. Se centrifugó 15 minutos a 2.300 g y el sobrenadante se fraccionó nuevamente con sulfato amónico recogiendo la fracción separada entre 0,3 y 0,6 saturación. Seis gramos de este precipitado se disolvieron en tampón fosfato 0,001 M, pH 7,4 y la disolución se dializó frente a agua destilada durante 14 horas. El dializado se centrifugó a 3.300 g durante 10 minutos y el sobrenadante se adsorbió en una columna de  $300 \times 18$  mm que contenía 40 g de DEAE-sefadex. Para la elución se hicieron pasar por la columna 250 ml de tampón fosfato 0,001 M, pH 7,4, recogiendo fracciones de 10 ml mediante un colector automático. Se observó que la actividad xantindeshidrogenásica estaba concentrada entre las fracciones 62 y 68, las cuales se precipitaron nuevamente con sulfato amónico entre 0,35 y 0,55 saturación (tabla IV).

TABLA IV

Purificación de la xantindeshidrogenasa de hígado de cerdo.

Preparado enzimático	Actividad específica $U \times 10^{-4} / \text{mg proteína}$	Purificación	
		Parcial	Total
Homogenado	0,2	—	—
Sobrenadante	0,4	—	—
Fracción 0,3-0,6 Saturación en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	2,9	7 veces	7 veces
Fracción tratada con tripsina	12,1	4,3 veces	30 veces
Fracción eluida n.º 66	43,0	3,5 veces	107 veces
Fracción 0,35-0,55 saturación en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	61,0	1,4 veces	152 veces

Las fracciones parcialmente purificadas fueron sometidas a electroforesis analítica (7 V/cm) sobre Celogel en tampón fosfato 0,05 H, pH 7,4, durante 4 horas: los electrogramas de la fracción proteica de partida, revelados con negro amido, muestran una gran complejidad de bandas, mientras que el producto purificado presenta una banda frontal bien definida, correspondiente a la xantindeshidrogenasa, seguida de otra mucho más débil y de menor velocidad migratoria.

#### ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS PREPARADOS PURIFICADOS.

Se determinaron los espectros de absorción en las zonas ultravioleta y visible de las fracciones purificadas de hígados de

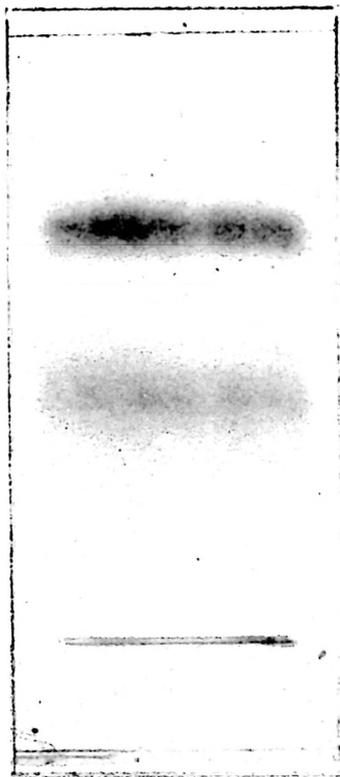


FIG. 2. Electroforesis de la fracción purificada precipitada entre 0,35 y 0,55 saturación de sulfato amónico.

cerdo y humano (fig. 3), así como las relaciones de extinción entre 280/450 y 410/450  $m\mu$ , cuyos valores para la de origen porcino fueron 6,8 y 1,9 y para el humano 5,7 y 3,4; estas relaciones son comparables con las halladas para la xantindeshidrogenasa obtenida a partir de hígado bovino [ $280/450 \leq 10$  y  $410/450 \leq 2$  (12)] e indican un aceptable grado de purificación de los preparados enzimáticos obtenidos.

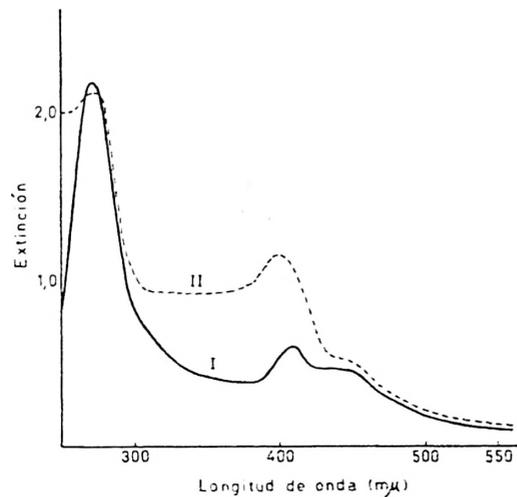


FIG. 3. I. Espectro del preparado purificado de hígado de cerdo, concentrado unas 152 veces. II. Espectro del preparado purificado de hígado humano, concentrado unas 65 veces.

#### DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LA XANTINDESHIDROGENASA.

Se han establecido las constantes de MICHAELIS-MENTEN para los enzimas hepáticos de cerdo y de hombre utilizando los preparados purificados por precipitación con sulfato amónico 0,3-0,6 saturación, y empleando xantina como sustrato. Los aceptores fueron el oxígeno molecular y el azul de metileno. La concentración del enzima purificado de cerdo utilizado era de  $10^{-2}$  U/ml y las concentraciones variables de xantina estuvieron comprendidas entre

$2,5 \times 10^{-5}$  y  $12 \times 10^{-5}$  M. Expresados los resultados según la ecuación de LINEVEAWER-BURCK, se obtuvo para la acción oxidásica un valor de la  $K_m = 2,28 \times 10^{-5}$  M. Siguiendo análogo método, pero operando en presencia de  $3 \times 10^{-4}$  M de azul de metileno, resultó para la  $K_m$  de la acción deshidrogenásica un valor igual a  $2,7 \times 10^{-5}$  M.

Cuando se experimentó con xantindeshidrogenasa hepática humana y operando en análogas condiciones, se obtuvo una  $K_m$  (azul de metileno) =  $3,1 \times 10^{-5}$  M.

Se determinaron asimismo las constantes de inhibición de la colchicina sobre la xantindeshidrogenasa purificada de hígado de suido, utilizando como aceptor el azul de metileno o el oxígeno molecular. Se empleó un preparado del enzima conteniendo  $10^{-4}$  U/ml, concentraciones de xantina de  $0,62 \times 10^{-4}$  M,  $0,37 \times 10^{-4}$  M y de colchicina:  $6,23 \times 10^{-3}$ ,  $3,12 \times 10^{-3}$  y  $1,25 \times 10^{-3}$  M. Para estudiar la acción deshidrogenásica se utilizaron idénticas condiciones experimentales, pero con adición de azul de metileno, cuya concentración en los incubados fue  $3,1 \times 10^{-4}$  M. En todos los casos la inhibición por la colchicina se ha mostrado como de tipo competitivo, habiéndose obtenido las siguientes constantes:  $K_i$  (oxígeno) =  $1,15 \times 10^{-3}$  M y  $K_i$  (azul de metileno) =  $1,16 \times 10^{-3}$  M.

Análogamente se experimentó con una disolución de xantindeshidrogenasa de hígado humano de actividad  $1,6 \times 10^{-2}$  U/ml, empleando azul de metileno como aceptor electrónico. Se comprobó la acción inhibidora de la colchicina obteniéndose un valor para la  $K_i = 2,5 \times 10^{-3}$  M.

### Discusión

El examen analítico de las actividades xantindeshidrogenásicas de cada una de las fracciones celulares de los homogenados hepáticos de cerdo y de hombre, separadas por centrifugación diferencial, pone de manifiesto que la actividad enzimá-

tica reside principalmente en el sobrenadante final, porción no sedimentable del citoplasma. Este resultado concuerda con los obtenidos por STAVISLAWOKI con hígado y duodeno de rata (19). En cambio, toda la actividad uricásica se manifiesta localizada en la fracción mitocondrial, que incluye los peroxisomas (5).

El incremento de las actividades xantindeshidrogenásica y uricásica observado al someter a diálisis los homogenados de hígado de cerdo, se pudo comprobar era debido a la eliminación de una sustancia inhibidora del enzima, la xantina. Es conocido el hecho de que concentraciones de esta purina de  $10^{-3}$  M son suficientes para inhibir considerablemente a la xantindeshidrogenasa (16) y totalmente a la uricasa (15). Así resulta que el elevado nivel normal de la hidroxipurina en el parénquima hepático puede provocar *in vivo* un estado de actividades enzimáticas condicionado, notablemente acusado en la rata, en el cerdo y en el hombre (la concentración de xantina de sus hígados supera el valor de  $10^{-3}$  M), constituyendo así un proceso de regulación uricogénica fisiológico que debe contribuir a limitar el nivel de ácido úrico en los organismos (3).

Prosiguiendo previos estudios de purificación de la xantindeshidrogenasa, se precipitó la proteína de los homogenados hepáticos con 0,3-0,6 saturación de sulfato amónico, consiguiéndose así, en general, una concentración parcial del orden de unas 5 ó 6 veces. Posteriormente, se llevaron a cabo varios intentos de ulterior purificación, utilizando tratamientos térmicos y por enzimas proteolíticos, adsorciones cromatográficas selectivas, y, finalmente, se adoptaron algunas técnicas (descritas en el texto del trabajo presente) que han permitido purificar la xantindeshidrogenasa hepática porcina —unas 152 veces— y la humana —unas 65 veces— evitando el empleo de prolongados tratamientos térmicos desnaturalizantes que ocasionan considerables pérdidas de la proteína enzimática.

Los estudios espectrofotométricos efectuados con los enzimas purificados de hígado de cerdo y humano (152 y 65 veces concentrados) aprecian un máximo de absorción a 280  $m\mu$ , característico de la porción proteica de la xantindeshidrogenasa, otro a 408  $m\mu$ , atribuible a su grupo prostético flavínico y una meseta a 450  $m\mu$  probablemente debida, según algunos autores (MORELL, KIELLY y otros), al Mo y Fe que contiene el enzima. La similitud de valores hallados de las constantes de MICHAELIS-MENTEN, así como de las de inhibición por la colchicina, para ambos preparados enzimáticos purificados, parecen indicar que el mecanismo que inicia las reacciones enzimáticas, enlazando una molécula del sustrato (xantina) con el Mo del grupo prostético del enzima, debe transcurrir por mecanismos muy parecidos, tanto en el caso de la xantindeshidrogenasa humana como en la porcina.

### Resumen

La actividad xantindeshidrogenásica de los homogenados hepáticos humanos y porcinos se halla localizada casi totalmente en la fracción soluble obtenida como sobrenadante, una vez separadas las fracciones particuladas de las células por centrifugación diferencial. La uricasa, en cambio, reside exclusivamente en la fracción mitocondrial.

Al precipitar con concentraciones crecientes de sulfato amónico las proteínas solubles de los homogenados hepáticos se observa que la actividad xantindeshidrogenásica se acumula en la fracción obtenida entre 0,3 y 0,6 saturación de la sal, y su actividad específica resulta así concentrada unas 5 ó 6 veces.

Para la purificación de la xantindeshidrogenasa hepática humana se empleó una precipitación fraccionada con sulfato amónico seguida de una cromatografía con DEAE-celulosa, lográndose así una purificación de unas 65 veces respecto al sobrenadante de partida. El enzima de hígado porcino se obtuvo después de una precipitación fraccionada con sulfato amónico, una incubación con tripsina y finalmente una cromatografía con DEAE-Sefade, lo que

ha permitido obtener un preparado dotado de una actividad xantindeshidrogenásica concentrada 152 veces.

Ambos preparados purificados presentan unas curvas de absorción en las zonas ultravioleta y visible, cuyo perfil se asemeja a las obtenidas con los enzimas de hígado de pollo y de ternera, con relaciones de extinción entre 280  $m\mu$ /450  $m\mu$  y 410  $m\mu$ /450  $m\mu$  que en el de origen porcino son 6,8 y 1,9, y en el humano 5,7 y 3,4. Estos valores indican un aceptable grado de purificación de los preparados.

Las constantes de Michaelis-Menten de la xantindeshidrogenasa hepática del suido halladas por nosotros son:  $K_m$  (oxígeno) =  $2,28 \times 10^{-5}$  M,  $K_m$  (azul de metileno) =  $2,7 \times 10^{-5}$  M. Para el enzima de hígado humano:  $K_m$  (azul de metileno) =  $3,1 \times 10^{-5}$  M. Las constantes de inhibición ( $K_i$ ) de la colchicina, inhibidor competitivo de la actividad xantindeshidrogenásica, son las siguientes: con la xantindeshidrogenasa de hígado de cerdo,  $K_i$  (oxígeno) =  $1,22 \times 10^{-3}$  M y  $K_i$  (azul de metileno) =  $1,14 \times 10^{-3}$  M; y con el enzima humano,  $K_i$  (azul de metileno) =  $2,5 \times 10^{-3}$  M.

### Summary

#### Hepatic Xanthinedehydrogenase. I. Purification and Properties of Human and Pig Hepatic Xanthinedehydrogenase

The xanthinedehydrogenase activity of human and porcine liver homogenates has been found to be located in the supernatants, when the particulated cell fractions have been previously separated by differential centrifugation, whereas uricase appears to be associated with the mitochondrial fraction.

When the soluble proteins of the hepatic homogenates are submitted to a fractional ammonium sulphate precipitation, xanthinedehydrogenase accumulates in the sediment obtained with a salt concentration of 0.3-0.6 saturation. The human enzyme can be further purified by means of a DEAE-Cellulose chromatographic separation, when its specific activity increases up to 65 times. Pig liver xanthinede-

hydrogenase has been purified first by a fractional precipitation with ammonium sulphate, followed by a controlled tryptic digestion and a chromatographic adsorption in a DEAE-Sefadex column: the enzymatic preparation thus obtained is about 152 times concentrated.

Both purified preparations show spectral absorption curves similar to chicken and calf liver xanthinedehydrogenases, and their extinction relationships at 280/450  $m\mu$  and 410/450  $m\mu$ , indicate a reasonable degree of purification of these enzymatic proteins.

The MICHAELIS-MENTEN constants of both enzymes are: pig liver xanthinedehydrogenase,  $K_m$  ( $O_2$ ) =  $2.28 \times 10^{-5}$  M;  $K_m$  (M. B.) =  $2.7 \times 10^{-5}$  M; human liver xanthinedehydrogenase,  $K_m$  (M. B.) =  $3.1 \times 10^{-5}$  M. Colchicine is a competitive inhibitor of both dehydrogenases: pig  $K_1$  ( $O_2$ ) =  $1.22 \times 10^{-3}$  M;  $K_1$  (M. B.) =  $1.14 \times 10^{-3}$  M; human  $K_1$  (M. B.) =  $2.5 \times 10^{-3}$  M.

### Bibliografía

1. AVIS, P. G., BERGEL, F., y BRAY, R. C.: *J. Chem. Soc.*, 1.100, 1955.
2. BROWN, H.: *J. Biol. Chem.*, 158, 600, 1945.
3. CARRASCO, E., MARTÍN-ESTEVE, J., y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.* (en prensa).
4. CORRAN, H. S., DEWAN, J. G., GORDON, A. H., y GREEN, D. E.: *Biochem. J.*, 33, 1694, 1939.
5. DE DUVE, C., y BANDHUIN, P.: *Physiol. Rev.*, 46, 326, 1966.
6. DOMINGO, E., BOZAL, J., y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, 23, 145, 1967.
7. GORNALL, A. G., BORDAWILL, C. S., y DAVID, M. M.: *J. Biol. Chem.*, 177, 751, 1949.
8. HOGEBOW, G. H., SCHNEIDER, W. C., y STRIEBICH, M. J.: *J. Biol. Chem.*, 196, 111, 1952.
9. HORECKER, B. L., y HEPPEL, L. A.: *J. Biol. Chem.*, 178, 683, 1949.
10. KALCKAR, H. M.: *J. Biol. Chem.*, 167, 429, 1947.
11. LANDON, E. J., y CARTER, CH., E.: *J. Biol. Chem.*, 235, 819, 1960.
12. MACKLER, B., MAHLER, H. R., y GREEN, D. E.: *J. Biol. Chem.*, 210, 149, 1954.
13. MARÍN, A., MARTÍN-ESTEVE, J., y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, 20, 165, 1964.
14. MARTÍN-ESTEVE, J., BOZAL, J., y CALVET, F.: *Fed. of Bioch. Europ. Soc. 1st Meet. Abst.*, p. 80, 1964.
15. PILSUM, J. F.: *J. Biol. Chem.*, 204, 613, 1953.
16. RAMIA, J., BOZAL, J., y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, 22, 85, 1966.
17. REMY, G., RICHERT, D. A., DOISY, R. J., WELLS, I. C., y WESTERFELD, W. W.: *J. Biol. Chem.*, 217, 293, 1955.
18. RICHERT, D. A., VANDERLINDE, R., y WESTERFELD, W. W.: *J. Biol. Chem.*, 186, 261, 1950.
19. STAVISLAWOKI, S. O., URIEL, J., AURAMEAS, S.: *Prot. Biol. Fluids Proc. Colloq.*, 12, 228, 1964.