

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Estudios cinéticos sobre la xantindeshidrogenasa hepática. — I. Actividad ante sustratos purínicos

por

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

(Recibido para publicar el 9 de junio de 1969)

La copresencia de las purinas xantina e hipoxantina determina notables variaciones en la velocidad de formación de ácido úrico, cuando la deshidrogenación catalizada por la xantindeshidrogenasa hepática de pollo se estudia con homogenados de hígado del ave operando en medio aerobio y en presencia de azul de metileno. Además, cada una de dichas bases separadamente provoca una inhibición por el propio sustrato, si su concentración en el medio excede de 1×10^{-4} M. Estos hechos, descritos en un trabajo previo (11), sugieren que la magnitud de la uricogénesis puede resultar considerablemente modificada por la concentración de los sustratos purínicos del enzima presentes en los citoplasmas de las células hepáticas. Las concentraciones de xantina en el hígado de diversos animales, y también en el del hombre, parecen ser considerablemente superiores a los respectivos valores de las constantes de Michaelis de las deshidroge-

nasas (3), de suerte que cualquier incremento sustancial de dicha concentración puede aminorar la actividad efectiva de la xantindeshidrogenasa. Este enzima, por otra parte, está estratégicamente situado al final de una cadena metabólica, la del catabolismo purínico, y, además el proceso que cataliza es irreversible (22). La xantindeshidrogenasa reúne, por lo tanto, las condiciones que se admiten como idóneas, para ser objeto de acciones reguladoras (28, 29).

Ahora bien, las acciones inductora o represora de la biosíntesis de la xantindeshidrogenasa ejercidas por los citados u otros metabolitos, se supone pueden intervenir también, regulando el nivel fisiológico de enzima y, en consecuencia, la capacidad uricogénica del tejido hepático; sin embargo, los resultados experimentales aparecen como contradictorios y no han permitido formular conclusiones definitivas (12, 25, 26).

Los dos aspectos de la regulación de la xantindeshidrogenasa indicados pueden tener trascendencia fisiológica, y su esclarecimiento podría contribuir a proporcionar

* Becario de la Fundación Juan March, 1966.

una interpretación del dismetabolismo hiperuricogénico.

Por las razones expuestas, hemos iniciado un estudio cinético de la influencia de varias purinas sobre la actividad de la xantindeshidrogenasa hepática, en presencia del aceptor electrónico fisiológico NAD (13, 19). El estudio de las velocidades iniciales de reacción del sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD (6) y la aplicación del método cinético de Dalziel al análisis de la inhibición por sustrato (8) en el mismo sistema, nos ha permitido sugerir una interpretación del fenómeno.

Finalmente, hemos investigado la influencia ejercida por las bases purina, xantina y adenina sobre la actividad de la xantindeshidrogenasa hepática, cuando se administran separadamente a polluelos por vía intraperitoneal.

Material y métodos

Como material enzimático hemos empleado un preparado purificado de xantindeshidrogenasa obtenido a partir de hígados de pollo, y purificado según las técnicas de tratamiento térmico y de fraccionamiento con sulfato amónico, descritas por WESTERFELD (24) y adaptadas por CARRASCO y col. (2) en nuestro laboratorio. La actividad específica del preparado utilizado por nosotros, establecida con xantina y azul de metileno, era de 11,5 U.I.

Las velocidades iniciales de reacción se determinaron espectrofotométricamente (Beckman D.U.) midiendo a 340 $m\mu$ el Δ D.O. debido a la reducción del NAD. Los ensayos se efectuaron a 30° C, en tampón fosfatos de pH = 7,4 (0,05 M).

La concentración de enzima que conviene utilizar debe permitir obtener una variación rectilínea de densidad óptica durante, al menos, unos tres minutos de reacción.

En las experiencias realizadas *in vivo* las bases xantina, adenina y purina en disolución isotónica de NaCl (0,9 % en

NaCl a pH = 7) fueron inyectadas intraperitonealmente a lotes de 8 polluelos; a otro lote de igual número de animales se les administró el mismo volumen de disolución salina isotónica, exento de bases púricas. En algunas experiencias las administraciones se prolongaron durante varios días, en cuyo período se inyectaban los animales cada 12 horas, aproximadamente. Los polluelos tuvieron, en todo momento, libre acceso al alimento y al agua. Se sacrificaron por decapitación a las 24 horas de la administración de la base en los ensayos de una sola dosis, y a las tres horas de la última administración en los otros casos. Se preparó un homogenado en tampón fosfatos (0,05 M) de pH = 7,4, con todos los hígados reunidos de los animales que recibieron la base púrica, y paralelamente otro homogenado con los de los animales inyectados con la disolución isotónica —de referencia—; la concentración de los homogenados fue de 0,08 g de tejido por cada 2,5 ml de suspensión. En cada uno de ellos, se determinó separadamente la actividad xantindeshidrogenásica empleando xantina (6×10^{-5} M y 4×10^{-4} M) como sustrato y azul de metileno como transportador, aplicando el procedimiento descrito en nuestro trabajo anterior (11). El ácido úrico se determinó mediante el método colorimétrico de BROWN (1). Una parte alícuota de los homogenados fue previamente dializada durante 48 horas frente a tampón —a fin de eliminar los sustratos endógenos— y después se comprobó su actividad enzimática de modo paralelo al indicado para los homogenados no dializados.

En algunos de los ensayos se determinó también la uricemia de los polluelos. La sangre, recogida en citrato sódico (3,8 %), se adicionó de ácido perclórico (concentración final 1 %) y las proteínas así precipitadas se separaron por filtración. En los filtrados perclóricos obtenidos se determinó la cantidad de ácido úrico presente mediante el reactivo de BROWN (1).

Resultados

VELOCIDADES INICIALES DE REACCIÓN DEL SISTEMA XANTINA-XANTINDESHIDROGENASA-NAD. Con el sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD hemos estudiado la influencia de distintas concentraciones de xantina y de NAD sobre la actividad del enzima. Las experiencias se han realizado operando con el preparado purificado antes descrito. Las determinaciones efectuadas con concentraciones variables de xantina y constante de NAD, muestran que la K_m (xantina) adquiere mayores valores al aumentar la concentración de NAD. A su vez, el valor de la K_m (NAD) crece al aumentar la concentración

TABLA I

Variaciones de la K_m (xantina) con la concentración de NAD, y de la K_m (NAD) con la concentración de xantina

[NAD] M	K_m (xantina) M	[xantina]	K_m (NAD) M
1×10^{-4}	$1,1 \times 10^{-5}$	5×10^{-4}	$3,5 \times 10^{-5}$
1×10^{-3}	$2,4 \times 10^{-5}$	1×10^{-4}	$4,6 \times 10^{-5}$
$1,2 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-5}$	1×10^{-3}	$4,6 \times 10^{-5}$

de xantina. Sin embargo, a partir de concentraciones lo suficientemente elevadas de NAD y de xantina, ambas constantes cinéticas ya permanecen prácticamente invariables. Los valores de la K_m obtenidos se indican en la tabla I. Con los datos experimentales de la zona rectilínea de la figura 2 hemos analizado las representaciones secundarias de las pendientes e intersecciones obtenidas, en función de la inversa de la concentración del sustrato NAD. Mediante dichas representaciones secundarias se obtienen los siguientes valores de los coeficientes cinéticos con que DALZIEL (8) expresa las ecuaciones de velocidad:

$$\phi_0 = 22,0 \left(\frac{\Delta D.O.}{\text{min.}} \right)^{-1}$$

$$\phi_1 = 5,0 \times 10^{-4} \left(\frac{\Delta D.O.}{\text{min.}} \right)^{-1} M$$

$$\phi_2 = 1,1 \times 10^{-3} \left(\frac{\Delta D.O.}{\text{min.}} \right)^{-1} M$$

$$\phi_{12} = 0 \left(\frac{\Delta D.O.}{\text{min.}} \right)^{-1} M^2$$

esto es, resultan los siguientes valores para las constantes de Michaelis: K_m (xantina) = $\frac{\phi_1}{\phi_0} = 2,2 \times 10^{-5} M$ y K_m (NAD) = $\frac{\phi_2}{\phi_0} = 5,0 \times 10^{-5} M$, magnitudes que están en buena concordancia con las reseñadas en la tabla I. Se observa que existe un sensible aumento del valor de la K_m (NAD) para concentraciones elevadas de xantina; esta variación es consecuencia de la inhibición por exceso de sustrato, que se estudia en un próximo apartado.

Una vez establecido el valor límite experimental de la K_m (xantina) (tabla I), la concentración constante de NAD con la que hemos trabajado en los ensayos sucesivos es $1,2 \times 10^{-3} M$.

Los valores de las velocidades iniciales de reacción obtenidos con varias concentraciones de xantina y de NAD, conducen a rectas paralelas en la representación de Lineweaver-Burk (fig. 1). De acuerdo con las predicciones teóricas de CLELAND (6, 7), el hecho de que la concentración de uno de los sustratos no afecte a la pendiente de las rectas obtenidas respecto al otro sustrato, indica que cada uno de ellos se combina con formas distintas de enzima, las cuales deben estar separadas — en la secuencia mecanística de la reacción — por alguna etapa irreversible, como es la liberación de alguno de los productos de la reacción no presentes inicialmente en el sistema — liberación previa a la fijación del segundo sustrato —, o la existencia de una etapa que implique una elevada variación de energía libre, en una reacción caracteriza-

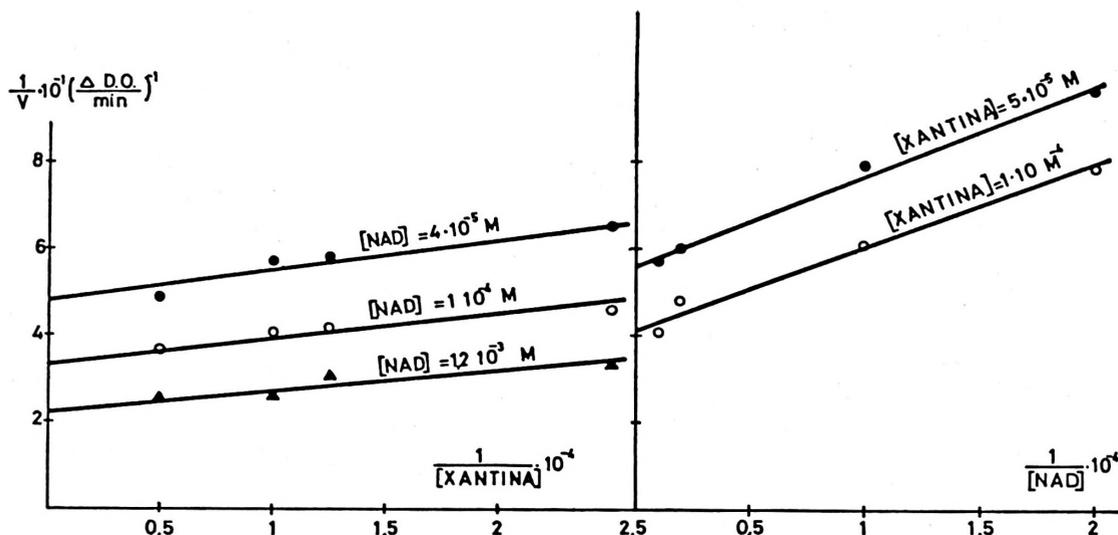
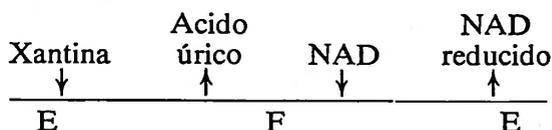


FIG. 1. Velocidades iniciales de reacción del sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD.

da por su elevado valor de la constante de equilibrio.

En la reacción catalizada por la xantindeshidrogenasa hepática que nos ocupa, el equilibrio se halla, efectivamente, desplazado hacia la formación de ácido úrico, conclusión basada en la minúscula velocidad de reducción del ácido úrico por el NAD reducido (22) y en la carencia de poder inhibitor del ácido úrico (1×10^{-4} M) sobre el sistema xantina-xantindeshidrogenasa, tanto empleando azul de metileno como transportador (11), como con el NAD (1×10^{-5} y 1×10^{-4} M) de aceptor electrónico. En consecuencia, si admitimos la formación reversible del complejo inicial enzima-xantina, los resultados experimentales de velocidad inicial de reacción sugieren, a nuestro entender, que la xantindeshidrogenasa hepática actúa según un mecanismo ping-pong (4), con la copresencia de dos formas del enzima, E y F — probablemente la forma oxidada y la reducida — al estado de libertad — esto es, no combinadas con los sustratos — durante la reacción:



Esta observación se halla en concordancia con lo publicado, durante el curso de nuestro trabajo, por RAJAGOPALÁN y HANDLER (22), con un preparado enzimático muy purificado.

INHIBICIÓN POR EL SUSTRATO XANTINA. De un modo semejante al de la xantinoxidasa de la leche (16), la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo presenta el fenómeno de la inhibición reversible por sus sustratos la xantina y la hipoxantina (11, 23). Hemos estudiado con el enzima hepático, la magnitud de la inhibición ejercida por el sustrato xantina a diversas concentraciones de NAD, siguiendo el método cinético desarrollado teóricamente por DALZIEL (8).

Al extender las mediciones de las velocidades iniciales de reacción del siste-

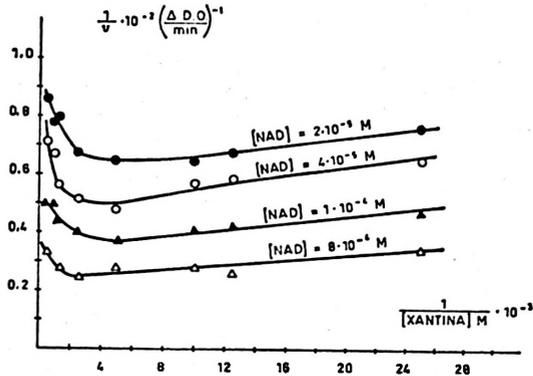


FIG. 2. Inhibición por sustrato en el sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD.

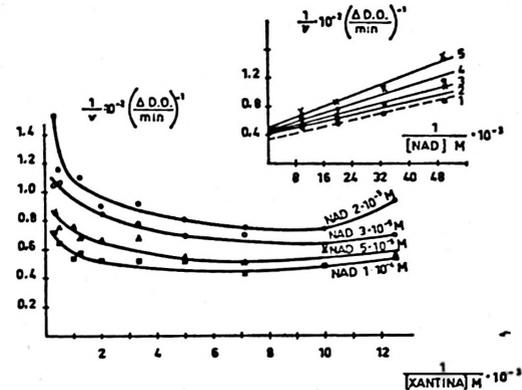


FIG. 3. Inhibición por sustrato en el sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD.

ma xantina-xantindeshidrogenasa-NAD a concentraciones de xantina superiores a 1×10^{-4} M, se observa que la representación de Lineweaver-Burk deja de ser rectilínea (fig. 2); la desviación corresponde a una disminución de la velocidad inicial de reacción. En las representaciones de la figura 3 se puede observar que la inhibición producida por exceso de xantina aumenta al disminuir la concentración de NAD presente en el sistema. Las rectas de la gráfica correspondiente a la representación con relación al NAD responden a las siguientes concentraciones fijas del sustrato inhibidor xantina: recta 1: 8×10^{-5} M; recta 2: 5×10^{-4} M; recta 3: 8×10^{-4} M; recta 4: 2×10^{-3} M, y recta 5: 3×10^{-3} M. En la figura se observa una variación de las pendientes de las rectas y de sus intersecciones con el eje de ordenadas. Este resultado corresponde a una inhibición por sustrato de tipo no competitivo (5, 8). La notable variación que acusa el valor de las pendientes de las rectas sugiere una competencia entre el NAD y el sustrato inhibidor; no obstante, el hecho de quedar afectado el valor de las velocidades máximas de reacción parece indicar que el desplazamiento por el NAD de la molécula del sustrato inhibidor no es total; esto es, que una concentración elevadísima de NAD — sa-

turación del enzima por el NAD— no llegaría a anular completamente la inhibición ejercida por el exceso de xantina. Efectivamente, incluso al operar con concentraciones de NAD hasta de 2×10^{-3} M, se ha manifestado la inhibición por exceso de xantina, aunque muy atenuada, tal como lo indican los resultados consignados en la figura 4.

Aceptando que la reacción transcurre por un mecanismo de tipo ping-pong, los resultados experimentales relatados parecen sugerir que la xantina presente a concentraciones superiores a 1×10^{-4} M, se combinaría, de forma anómala, con el enzima reducido existente en forma libre durante la catálisis, el cual, en la secuencia catalítica normal, se combina con el NAD. La variación de valores de las velocidades máximas de reacción que se observa con las diversas concentraciones de xantina, parece indicar que ambos sustratos, el NAD y la xantina — inhibidora — no se unen al mismo centro activo de la forma reducida de la xantindeshidrogenasa, sino a locus distintos, aunque relacionados. El carácter no competitivo de la inhibición se explicaría también si la xantina, además de entablar una competencia estricta con el NAD por la forma reducida del enzima, se ensamblase a alguna otra forma de la xantindeshidrogenasa — por ejem-

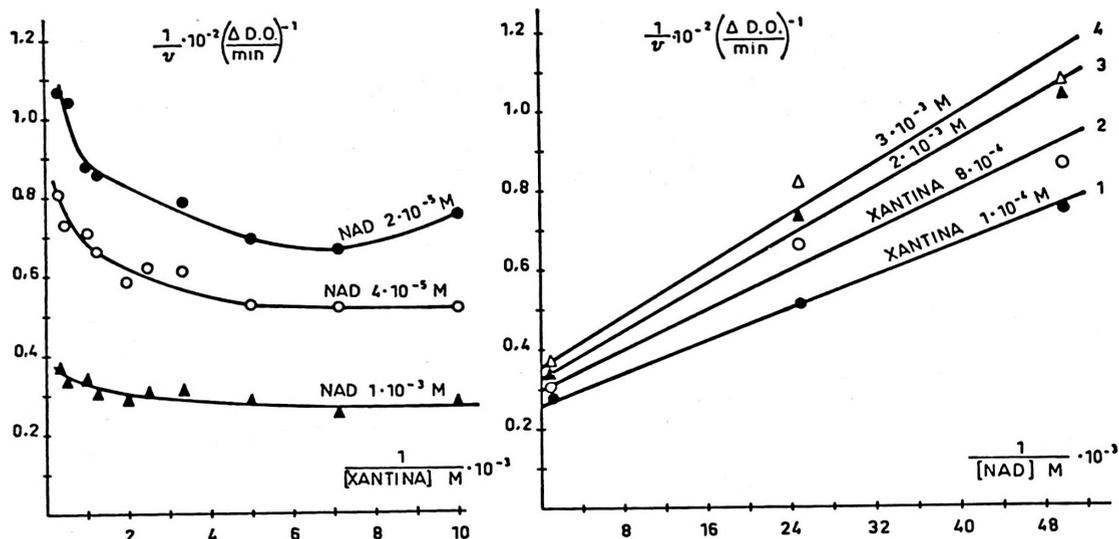


FIG. 4. Inhibición por sustrato en el sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD.

plo, a un complejo transitorio central (4)—. La hipoxantina ($K_m = 3,4 \times 10^{-5}$ M, con NAD $1,2 \times 10^{-3}$ M) también provoca inhibición por sustrato, empleando NAD como aceptor electrónico. Hemos podido comprobar que la magnitud de la inhibición es insensible a la presencia de concentraciones elevadas de KCl (0,20 M) (figura 5).

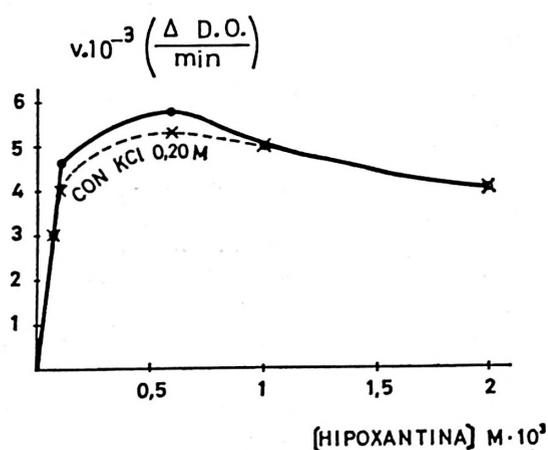


FIG. 5. Inhibición de la xantindeshidrogenasa por sustrato hipoxantina ($[NAD]=1,2 \times 10^{-3}$ M).

LA ADENINA Y LA PURINA COMO SUSTRATOS DE LA XANTINDESHIDROGENASA. Las bases adenina y purina reducen, aunque muy lentamente, al NAD ($1,2 \times 10^{-3}$ M) con el concurso catalítico de la xantindeshidrogenasa hepática purificada. En la figura 6 se indican las velocidades de transformación de cada una de ambas purinas, en comparación con la de la xantina; ha resultado que guardan entre sí la relación aproximada siguiente: adenina, 1; purina, 8; xantina, 80. Estos valores relativos permiten considerar a la purina como un sustrato mediano de la xantindeshidrogenasa hepática de pollo, en tanto que la adenina, por la lentísima reducción del NAD que provoca, no puede realmente clasificarse entre los sustratos deshidrogenables por el enzima.

ACCIÓN DE LA XANTINDESHIDROGENASA SOBRE MEZCLAS DE PURINAS. En la actuación de la xantindeshidrogenasa sobre dos sustratos purínicos copresentes, cabe suponer que ambos se transformen sobre una misma forma del enzima fijándose al mismo centro activo. En tal caso, las dos

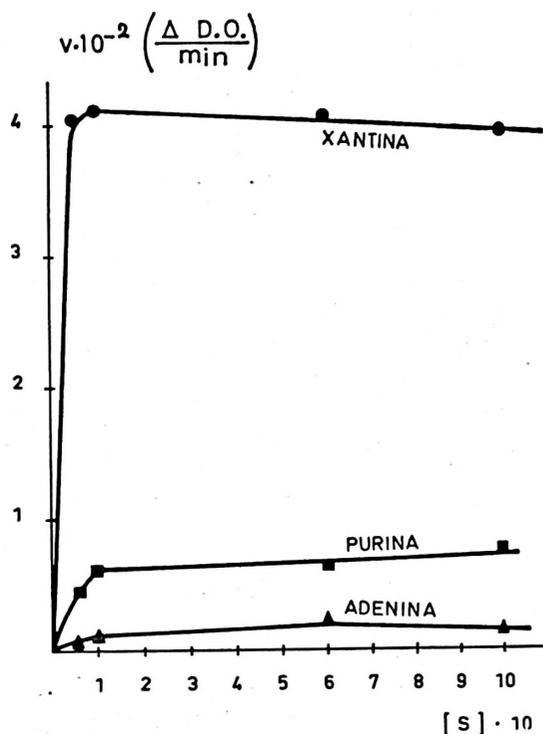


FIG. 6. Velocidades de transformación de xantina, purina y adenina por el sistema xantindeshidrogenasa-NAD.

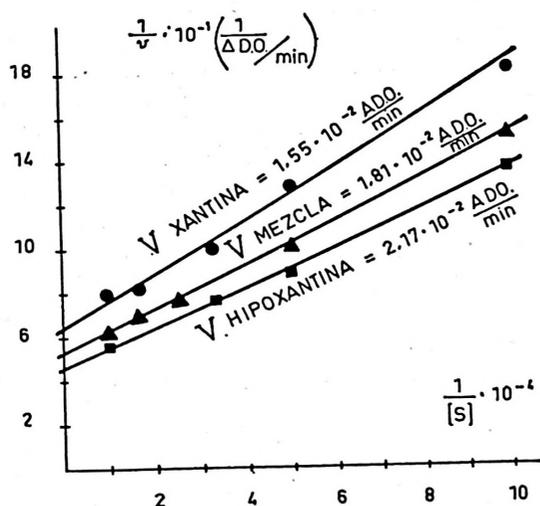


FIG. 7. Transformación de xantina (●), hipoxantina (■) y mezclas equimolares de ambas (▲) por el sistema xantindeshidrogenasa-NAD ([NAD] = 1,2 × 10⁻³ M).

reacciones serán interdependientes y entre ambos sustratos se establecerá una competencia por un mismo locus activo del enzima; al realizar los ensayos en presencia de una concentración lo suficientemente elevada de NAD, tendrá vigencia la siguiente relación cinética (9):

$$\frac{V_1 - V_m}{V_m - V_2} = \frac{K_m(1)}{K_m(2)}$$

en la que V_1 y V_2 son las velocidades máximas de reacción para cada uno de los sustratos; $K_m(1)$ y $K_m(2)$, sus respectivas constantes de Michaelis y V_m la velocidad máxima de reacción para la mezcla equimolar de sustratos.

Hemos determinado las velocidades máximas de transformación de la xantina, de la hipoxantina y de mezclas equimolares de ambos sustratos, manteniendo constantes las concentraciones de xantindeshidrogenasa y de NAD ($1,2 \times 10^{-3}$ M). Se establecieron espectrofotométricamente las cantidades de NAD reducido por cada una de las bases, así como por las mezclas equimolares de ambas. Los resultados se expresan en la figura 7. La velocidad máxima de transformación de la mezcla muestra un valor intermedio entre los obtenidos operando con cada uno de los sustratos por separado. Sustituyendo los valores numéricos de las velocidades máximas y de las constantes de Michaelis en la expresión cinética antes anunciada, resulta la proporción $3,6/2,6 = 3,4/2,4$. El resultado sugiere que ambos sustratos se transforman precisamente en un centro activo común.

Al realizar un experimento paralelo con xantina, purina y mezclas equimolares de ambas bases obtuvimos los resultados que se recogen en la figura 8. El valor de la K_m (purina) obtenido es 1×10^{-5} M. Sustituyendo los valores numéricos en la relación cinética anterior, encontramos que la relación del primer miembro es $2,6/2,2$, mientras que la del segundo resulta ser $2,4/1,0$. En experiencias de inhibición

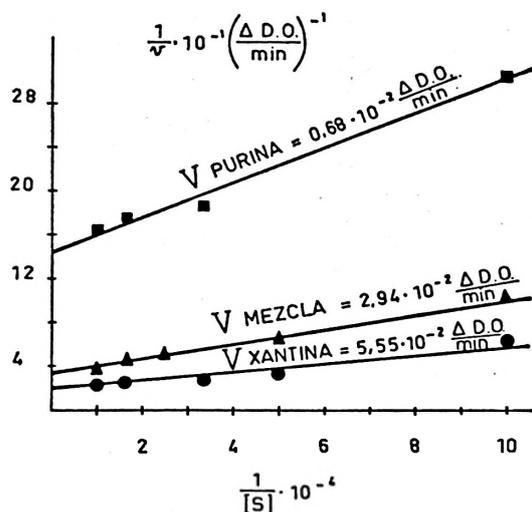


Fig. 8. Transformación de xantina, purina y mezclas equimolares de ambas por el sistema xantindeshidrogenasa-NAD ($[NAD] = 1,2 \times 10^{-3} M$).

realizadas posteriormente (10) obtuvimos $K_i = 3,3 \times 10^{-5} M$ para la purina, al actuar como inhibidor del sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD ($1,2 \times 10^{-3} M$), valor que, tomado en cuenta para la relación cinética, proporcionaría un resultado más concordante. Esta divergencia puede atribuirse a la lenta velocidad de transformación de la purina al funcionar como sustrato del sistema. El resultado sugiere que ambas purinas se transforman en un mismo centro activo enzimático, tal como lo hemos podido confirmar mediante ensayos de inhibición (10).

El conjunto de resultados obtenidos con mezclas de bases púricas indica que la acción deshidrogenante de la xantindeshidrogenasa sobre las bases purina, hipoxantina y xantina, en presencia del aceptor electrónico fisiológico NAD, se localiza en un mismo centro activo del enzima.

EXPERIENCIAS «IN VIVO». Los resultados experimentales que hemos obtenido trabajando *in vitro* muestran que las ba-

ses púricas libres modifican considerablemente la actividad catalítica de la xantindeshidrogenasa hepática (10, 11); este fenómeno podría constituir en un mecanismo de regulación de la uricogénesis fisiológica.

La regulación de la biosíntesis del ácido úrico por las purinas presenta otro aspecto de interés: se trata de la influencia que las bases pueden ejercer sobre los procesos de biosíntesis de la xantindeshidrogenasa *de novo*. Mediante los experimentos *in vivo*, que a continuación se exponen, hemos tratado de establecer si la administración intraperitoneal de bases púricas a polluelos provoca alguna variación en la actividad y en el nivel de la xantindeshidrogenasa de su hígado.

Los resultados obtenidos al administrar intraperitonealmente diversas dosis de las bases xantina, adenina y purina se resumen en la tabla II. Las series de dos cifras que en ella se indican corresponden a los ensayos de actividad enzimática determinados frente a xantina $6 \times 10^{-5} M$ y $4 \times 10^{-4} M$, respectivamente.

La comprobación de los resultados obtenidos al inyectar xantina indica que la base ha provocado una ligerísima disminución de la actividad xantindeshidrogenásica, en concordancia con las observaciones de otros autores (26). En cambio, las conclusiones de nuestras experiencias con adenina no confirman la posibilidad apuntada por los mismos autores (26) de que dicha base provoque un aumento de la actividad de la deshidrogenasa. Tampoco la administración de purina, análogo estructural de los sustratos fisiológicos — que *in vitro* se muestra como mejor inhibidor que sustrato (10) — ha provocado variación en la actividad de la xantindeshidrogenasa hepática observada.

En todos los casos en que se ha analizado, se observa un ligero aumento de la uricemia, explicable por ser las bases inyectadas precursoras del ácido úrico. La purina, se admite, resulta oxidada hasta ácido úrico en los organismos, con forma-

TABLA II

Efecto de la inyección intraperitoneal de bases púricas sobre la actividad xantindeshidrogenásica de hígado de pollo

Base púrica Inyectada y dosis* (mg/kg peso animal)	Edad polluelos Días	N.º de Inyec- ciones	Homogenado no dializado		Homogenado dializado		Acido úrico en sangre (μ moles/ml)	
			Actividad control	Actividad purinas	Actividad control	Actividad purinas	control	purinas
Xantina (17)	10	1	0,32	0,26	0,21	0,15	—	—
Xantina (30)	10	1	0,94	0,81	0,75	0,54	—	—
Xantina (24)	10	13	1,13	0,99	0,78	0,66	—	—
Xantina (24)	10	13	1,18	1,18	1,13	1,07	0,44	0,50
Xantina (24)	10	13	1,44	1,31	1,19	0,95	—	—
Adenina (40)	15	5	2,02	1,90	1,55	1,55	—	—
Adenina (40)	15	5	2,14	2,26	1,79	1,66	—	—
Adenina (66)	10	15	1,19	1,26	0,78	0,75	0,33	0,41
Adenina (66)	10	15	1,55	1,31	1,19	0,90	—	—
Purina (30)	13	1	1,03	1,10	0,98	0,87	—	—
Purina (30)	13	1	1,55	1,42	1,19	1,19	—	—
Purina (66)	13	1	0,85	0,85	0,56	0,45	—	—
Purina (66)	13	1	—	—	—	—	—	—
Purina (25)	10	6	1,84	1,69	1,13	1,42	—	—
Purina (25)	10	6	2,23	1,97	1,67	1,67	—	—
Purina (33)	15	11	1,31	1,22	0,71	0,87	0,34	0,40
Purina (33)	15	11	1,83	1,83	1,55	1,43	—	—

* Las dosis indicadas están referidas a una administración.

ción intermedia de hidroxipurinas (14, 17, 21).

Discusión

El conjunto de resultados cinéticos correspondientes al sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD indican la existencia de una etapa irreversible entre los respectivos instantes de adición de los sustratos xantina y NAD al enzima. Esta conclusión sugiere que la reacción transcurre probablemente, según un mecanismo ping-pong. Admitido ello, la inhibición por sustrato, de tipo no competitivo, parece ser consecuencia de la combinación de la xantina — presente en concentraciones supe-

rior a 1×10^{-4} M — con la forma del enzima reducido, que en la secuencia reaccional normal se combina con el NAD. Al comparar los resultados que HOFSTEE publicó después de estudiar la inhibición por sustrato xantina en la xantinoxidasa de la leche (16), con los que hemos obtenido para el enzima hepático, se pone de relieve que, en ambos casos, la inhibición se debe probablemente a la combinación de la xantina, en competencia con el respectivo aceptor electrónico, con una forma — o con un locus — enzimática *anómala*; el no haber considerado al oxígeno como a una variable cinéticamente significativa, este aspecto del problema — que, de confirmarse, añadiría otra analogía a las ya observadas entre ambos enzimas (20, 22) —

no fue comprobado en el caso del enzima de la leche.

La inhibición del enzima hepático por sus sustratos puede tener, a nuestro juicio, implicaciones fisiológicas importantes: en efecto, el NAD, que se admite es el aceptor electrónico fisiológico directo del enzima (13, 19), modifica la magnitud de la inhibición por la xantina, de suerte que un incremento circunstancial de la concentración de NAD contrarrestaría la acción inhibitoria del sustrato, incrementando la uricogénesis. Es decir, podría establecerse una relación entre la actividad de otros sistemas dependientes del NAD o del NAD reducido y la actividad xantindeshidrogenásica. En efecto, la reoxidación de la forma reducida del NAD tiene lugar por la acción deshidrogenante de la lacticodehidrogenasa, principalmente (18), que funciona así de un modo acoplado con el de la xantindeshidrogenasa; una actividad exacerbada de la deshidrogenasa láctica hepática — que presenta también inhibición por sustrato (15, 27), siendo su composición en isoenzimas la normal — produciría incrementos de las cantidades de NAD, las cuales inducirían a una elevación de la velocidad de formación de ácido úrico, al tiempo que atenuarían las posibles acciones de inhibición ejercidas sobre la xantindeshidrogenasa por los propios sustratos. La verosimilitud de estas interacciones viene apoyada por los niveles notables que alcanza la base xantina en el hígado de diversos animales (3).

Por otra parte, la competencia de todas las bases púricas por un mismo centro enzimático activo debe traducirse en notables modificaciones de la actividad xantindeshidrogenásica (10).

De nuestras experiencias *in vivo* parece deducirse, por otra parte, que las posibles acciones reguladoras ejercidas por las purinas deben obedecer a la modificación introducida en la actividad catalítica del enzima, y no a su influencia sobre los pro-

cesos biosintetizadores de la xantindeshidrogenasa.

Resumen

La determinación de las velocidades iniciales de reacción del sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD indica, de acuerdo con las predicciones teóricas de Cleland, que existe una etapa irreversible entre los instantes de unión de ambos sustratos al enzima. La irreversibilidad puede consistir en la liberación de uno de los productos de la reacción, previa a la fijación del segundo, o bien en la existencia de una etapa que implique una elevada variación negativa de energía libre. Los valores límite de las constantes de Michaelis hallados son: K_m (xantina) = $2,4 \times 10^{-5}$ M y K_m (NAD) = $4,6 \times 10^{-5}$ M.

Al extender las determinaciones de las velocidades iniciales de reacción a concentraciones de xantina o hipoxantina superiores a 1×10^{-4} M, se pone de relieve que la xantindeshidrogenasa presenta el fenómeno de inhibición por sus sustratos purínicos. Esta inhibición, analizada por el método cinético de Dalziel, es de tipo no competitivo: las concentraciones elevadas de NAD la atenúan pero no la anulan completamente.

La adenina, la purina y la xantina son transformadas por la xantindeshidrogenasa hepática en presencia de NAD, a velocidades de reacción que guardan entre sí la relación aproximada siguiente: adenina, 1; purina, 8; xantina, 80. Estos valores permiten considerar a la purina como un sustrato mediano de la xantindeshidrogenasa, en tanto que la adenina no puede realmente clasificarse entre los sustratos deshidrogenables por el enzima. Al estudiar las velocidades máximas de transformación de los sustratos purina, hipoxantina, xantina y mezclas equimolares de dos de ellos, se observa que verifican la relación cinética correspondiente a la transformación de los sustratos purínicos en un mismo centro activo enzimático.

La administración intraperitoneal a polluelos de las bases purina, adenina o xantina no ha provocado ninguna variación apreciable del valor de la concentración de la xantindeshidrogenasa hepática.

Nuestros resultados experimentales sugieren que la acumulación circunstancial en el hígado de sustratos purínicos puede contribuir a una regulación fisiológica de la uricogénesis.

Summary

Kinetic Studies on Liver Xanthine dehydrogenase. — I. Activities with Purine Substrates

The initial reaction velocities observed in the xanthine-xanthine dehydrogenase-NAD system, according to the theoretical prediction method of Cleland, points to the existence of an irreversible step between the respective times of addition of both substrates to the enzyme. The limiting values found for the Michaelis constants are: K_m (xanthine) = $2,4 \times 10^{-5}$ M and K_m (NAD) = $4,6 \times 10^{-5}$ M.

On extending the initial velocity measurements to concentrations of xanthine or hypoxanthine surpassing 1×10^{-4} M, it is apparent that liver xanthine dehydrogenase undergoes inhibition by its own substrates. Such an inhibition, when analyzed by Dalziel's method, proves to be of a non competitive type: although high concentrations of NAD do attenuate it, the inhibition does not become completely nullified.

Adenine, purine and xanthine are dehydrogenated by liver xanthine dehydrogenase at the following ratio of reaction velocities: adenine, 1; purine, 8; xanthine, 80. These permit purine to be considered as a middling substrate of xanthine dehydrogenase, while adenine cannot really be classed among the substrates of the enzyme. On studying the maximum velocities of transformation of purine, hypoxanthine, xanthine and of equimolar mixtures of two of them, it is observed that they fulfil the kinetic relationship which indicates that the chemical changes undergone by these substrates takes place at the same active centre of the enzyme.

Intraperitoneal administration of purine, adenine or xanthine did not give rise to any variation of the liver xanthine dehydrogenase level.

Our experimental results suggest that any circumstantial accumulation of puric substrates in the liver could contribute to

the physiological regulation of uricogenesis.

Bibliografía

1. BROWN, H.: *J. Biol. Chem.*, **158**, 602, 1945.
2. CARRASCO, E.: Tesis Doctoral, Barcelona, 1967.
3. CARRASCO, E., MARTIN, E. J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **24**, 193, 1968.
4. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104, 1963.
5. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 173, 1963.
6. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 188, 1963.
7. CLELAND, W. W.: *Ann. Rev. Biochem.*, **36**, I, 77, 1967.
8. DALZIEL, K.: *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1706, 1957.
9. DIXON, M. y WEBB, E. C.: In «Enzymes». Academic Press, New York, 1958. p. 91.
10. DOMINGO, E.: Tesis Doctoral. Barcelona, 1969.
11. DOMINGO, E., BOZAL, J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **23**, 145, 1967.
12. FEIGELSON, P.: *Science*, **120**, 502, 1954.
13. FELIG, J., y WILEY, C.: *Nature*, **181**, 51, 1958.
14. GORDON, M. P.: *J. Biol. Chem.*, **229**, 641, 1957.
15. HAKALA, M. T., GLAID, A. J. y SCHWERT, G. W.: *J. Biol. Chem.*, **221**, 191, 1956.
16. HOFSTEE, B. H.: *J. Biol. Chem.*, **216**, 235, 1955.
17. JAMISON, C. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 106, 1963.
18. LANDON, E. J., y CARTER, C. E.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 819, 1960.
19. MORELL, D. B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 221, 1955.
20. NELSON, A. C. y HANDLER, P.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 5368, 1968.
21. RAJAGOPALAN, K. V. y HANDLER, P.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2027, 1964.
22. RAJAGOPALAN, K. V. y HANDLER, P.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 4097, 1967.
23. RAMIA, J., BOZAL, J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **22**, 85, 1966.
24. REMY, C., RICHERT, D. A., DOISY, R. J., WELLS, I. C. y WESTERFELD, W. W.: *J. Biol. Chem.*, **217**, 293, 293, 1955.

25. SPADONI, M. A.: *Experientia*, **24**, 897, 1968.
26. STIRPE, F. y DELLA CORTE, E.: *Biochem. J.*, **94**, 309, 1965.
27. VESSEL, E. S.: *Nature*, **210**, 421, 1966.
28. WATTS, R. W. E.: *Proc. Roy. Soc. Med.*, **59**, 287, 1966.
29. YATES, R. A. y PARDEE, A. B.: *J. Biol. Chem.*, **221**, 757, 1956.