

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Xantindeshidrogenasa hepática. II. Aceptores de electrones enzimáticos acoplados

por

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

(Recibido para publicar el 14 de mayo de 1968)

La biosíntesis del ácido úrico que, en su última etapa, — xantina a úrico — depende del enzima xantindeshidrogenasa, puede ser regulada a este nivel por la concentración del enzima presente en el hígado, pero también por las concentraciones de los sustratos y de los aceptores electrónicos de la deshidrogenación. Por otra parte, parece probable que la biosíntesis del propio enzima sea inducible por factores, tales como la concentración histórica de purinas y de sus derivados (4, 5, y 6). HOFSTEE (12) observó que la xantinoxidasa de la leche resultaba inhibida *in vitro* por concentraciones excesivas del sustrato xantina, y RAMIA, BOZAL y CALVET (19) comprobaron un fenómeno análogo con las xantindeshidrogenasas de pollo, de cerdo y de leucocitos. Posteriormente, DOMINGO, BOZAL y CALVET (5) hallaron que la inhibición se provoca asimismo por concentraciones altas de otras purinas. Determinando el nivel hepático en xantina normal de algunos animales, nosotros hemos observado (3) que, ciertamente, la concentración fisiológica de la base en la glándula es suficiente para in-

ducir una inhibición considerable del enzima (3).

Las mayores diferencias de comportamiento entre los distintos enzimas deshidrogenantes de la xantina, se aprecian al considerar los respectivos aceptores electrónicos de sus respectivos funcionalismos. En efecto, la xantinoxidasa de la leche de vaca, así como las xantindeshidrogenasas del hígado de cerdo, rata, ternera o de microorganismos, pueden utilizar tanto el oxígeno como al citocromo C; sin embargo, las procedencias de hígado o de riñón de pollo o pichón son deshidrogenasas anaerobias, utilizando eficazmente el NAD^+ como aceptor, mas son poco activas frente al citocromo C. MORELL (16), LANDON y CARTER (13) y RAJAGOPALAN (18) también observaron que las xantindeshidrogenasas de hígado y riñón de ave, funcionaban con el NAD^+ como aceptor. Por otra parte, BERNHEIM (1), operando con cortes de hígado, y MORELL (16), con cortes y homogenados de hígado de pollo, hallaron que el piruvato también actuaba como aceptor indirecto de la reacción.

En este Trabajo se han extendido estos estudios a las xantindeshidrogenasas humana y porcina, y además se han conseguido pruebas experimentales respecto del acoplamiento de la xantindeshidrogenasa con otros sistemas enzimáticos oxidorreductores que permiten al enzima la utilización de determinados aceptores electrónicos remotos, sugiriendo nuevas concepciones para los mecanismos de autorregulación fisiológica de la uricogénesis.

Material y métodos

Las xantindeshidrogenasas de hígado de pollo, cerdo y humana, se prepararon según las técnicas descritas anteriormente por CARRASCO, MARTÍN-ESTEVE, y CALVET (3). La xantinoxidasa de la leche utilizada procedía de la General Biochemicals (Ohio). Tanto la lacticodeshidrogenasa de músculo cardíaco de cerdo y la glutamicodeshidrogenasa de hígado de buey cristalizada, como el NAD^+ y el NADH , se adquirieron de la casa Boehringer. La xantina procedía de la casa Merck y el α -oxoglutarato y el piruvato utilizados eran productos puros de Scharldt.

Las concentraciones proteicas se determinaron por el método colorimétrico del biuret (9) y las actividades xantindeshidrogenásicas, estableciendo el ácido úrico producido, empleando el método colorimétrico de BROWN (2).

La valoración de la actividad lacticodeshidrogenásica se practicó utilizando el método de REEVES y FIMOGNARI (20), convenientemente adaptado a nuestros experimentos y basado en la medición del máximo de absorción del NADH a $340\text{ m}\mu$. Cuando la determinación se hizo en presencia de colchicina, para soslayar su interferencia espectrofotométrica, se adoptó la técnica siguiente: en un tubo de ensayo de 10 ml sumergido en un termostato a 30° , se introducen 1 ml de disolu-

ción de piruvato $2 \times 10^{-3}\text{ M}$, 1 ml de NADH $2,5 \times 10^{-3}\text{ M}$, 0,5 ml de lacticodeshidrogenasa de 0,18 U/ml y 1 ml de disolución tampón fosfato 0,05 M, pH 7,4 o bien 1 ml de la disolución del inhibidor — colchicina — en dicho tampón. A los 1, 3 y 7 minutos de incubación se extraen volúmenes de 1 ml que se vierten en sendos tubos conteniendo 1 ml de ácido tricloroacético al 50 %, se dejan en reposo durante 10 minutos y se filtran. En los líquidos filtrados se determina el ácido pirúvico según la siguiente técnica colorimétrica: en un tubo de centrífuga de 10 ml se introduce 1 ml del líquido filtrado y se mantiene durante 10 minutos en un termostato a 25° , adicionándole a continuación 0,35 ml del reactivo de Lloyd (disolución al 0,1 % de 2,4-dinitrofenilhidrazina en ClH 2 N) y se prosigue la calefacción durante 5 minutos más, para la formación de la hidrazona del ácido pirúvico. Esta se extrae del líquido mediante 1 ml de etilbenceno, decantando la capa acuosa que se desecha. A la fase orgánica se le adicionan 2 ml de disolución de carbonato sódico al 10 %, agitando para asegurar la extracción cuantitativa de la hidrazona por la disolución alcalina, centrifugando si las dos fracciones no quedan bien separadas. 1,5 ml de la disolución de carbonato se alcaliniza incorporándole su volumen de NaOH 1,5 N, y la mezcla se introduce en un termostato regulado a 25° durante 5 minutos, para el desarrollo completo del color. Seguidamente se lee la extinción a $420\text{ m}\mu$.

Para la determinación de la actividad glutamicodeshidrogenásica se han utilizado dos métodos. La técnica espectrofotométrica fue esencialmente la descrita por GERLACH (8), empleando ácido oxoglutarico como sustrato, operando en presencia de NADH y de ClNH_4 y midiendo la disminución de la extinción a $340\text{ m}\mu$ en función del tiempo. Para el ensayo de la actividad enzimática en presencia de colchicina, se recurrió a la determinación del oxoácido no transformado, mediante el

método de FRIEDEMANN y HAUGEN (7). La técnica utilizada es la siguiente: en un matraz de incubación situado en un termostato a 30° se vierten 0,5 ml de CINH_4 2,2 M, 0,5 ml de disolución de oxoglutarato 4×10^{-3} M, 1 ml de NADH $2,5 \times 10^{-3}$ M, 1 ml de tampón 0,05 M de pH 7,4 o de la disolución en el mismo tampón de la sustancia inhibidora a ensayar; finalmente se adicionan 0,5 ml de una disolución de glutamicodeshidrogenasa de 0,1 U/ml. Se extraen muestras

de 1 ml a los 1, 3 y 7 minutos de incubación, y se vierten sobre 1 ml de ácido tricloroacético al 50 %. Pasados 10 minutos los líquidos se filtran y se determina el oxoácido de un modo semejante al descrito para la determinación del piruvato, teniendo en cuenta que el tiempo de calefacción recomendado, para la formación completa de la hidrazona correspondiente al ácido α -oxoglutarico, es de 25 minutos y que ésta debe extraerse de la capa acuosa mediante 2 ml de alcohol bencílico.

TABLA I

Actividades de distintos preparados xantindeshidrogenásicos frente al oxígeno y al azul de metileno

Preparados enzimáticos	Preparados crudos		Relación de actividades $\text{O}_2/\text{A.M.}$	Preparados purificados		Relación de actividades $\text{O}_2/\text{A.M.}$
	Actividad en $\text{U} \times 10^{-3}/\text{mg. proteína}$			Actividad en $\text{U} \times 10^{-3}/\text{mg. proteína}$		
	Azul de metileno	Oxígeno		Azul de metileno	Oxígeno	
Oxidasa de la leche (cristalizada)	—	—		155	81	0,52
Xantindeshidrogenasa hepática de pollo	0,50	0,02	0,04	4,80	Inapreciable	$\approx 0,00$
Xantindeshidrogenasa hepática de cerdo	0,28	0,16	0,57	1,65	0,84	0,50
Xantindeshidrogenasa hepática humana	0,23	0,13	0,56	8,05	4,08	0,50

Los preparados crudos se obtuvieron homogenizando 1 g de glándula hepática con 5 ml de tampón fosfato 0,05 M de pH 7,4, seguida de posterior centrifugación a 3.300 g. Se ensayaron las actividades de los sobrenadantes. Los preparados purificados de ave y cerdo se obtuvieron por precipitación con sulfato amónico de los homogenados hepáticos y separación de las fracciones proteicas obtenidas entre 0,3 y 0,6 de saturación de sulfato. El preparado purificado de hígado humano se obtuvo mediante la técnica cromatográfica expresada en el trabajo anterior (3). La concentración de xantina empleada en las determinaciones fue 6×10^{-5} M y la de azul de metileno $3,1 \times 10^{-4}$ M. Las incubaciones se practicaron a 30°.

TABLA II

Actividades xantindeshidrogenásicas frente al azul de metileno y el NAD⁺.

Preparados enzimáticos purificados	Actividades en Ux10 ⁻³ /mg proteína		Relación de actividades NAD ⁺ /A.M.
	Azul de metileno	NAD ⁺	
Xantindeshidrogenasa de pollo	3,68	2,88	0,78
Xantindeshidrogenasa de cerdo	5,40	2,40	0,44

Los preparados enzimáticos se incubaron en termostato a 30°, operando en corriente de nitrógeno. Las concentraciones de sustrato y aceptores electrónicos fueron: xantina, $6,6 \times 10^{-3}$ M, azul de metileno 10^{-3} M y NAD⁺ $1,2 \times 10^{-3}$ M.

Resultados y discusión

COMPORTAMIENTO DE LAS XANTINDESHIDROGENASAS FRENTE AL OXÍGENO Y A OTROS ACEPTORES ELECTRÓNICOS.

Se ha estudiado comparativamente el comportamiento de preparados de xantindeshidrogenasas de distintos orígenes, frente al oxígeno molecular (actividad oxidásica) y frente al azul de metileno (actividad deshidrogenásica) como aceptores (tabla I).

Operando en condiciones anaerobias con preparados purificados de pollo y de cerdo (concentrados 7,3 y 19 veces), frente a NAD⁺ y a azul de metileno, se obtuvieron los siguientes resultados comparados (tabla II).

De la tabla I se deduce que la deshidrogenasa del ave, una vez purificada, pierde completamente su aparente actividad oxidásica (compárese con WESTERFIELD y col. [21]), es decir, parece tratarse de una deshidrogenasa típica; por el contrario, la procedente del suido y la humana conservan sus actividades frente al oxígeno molecular. Tanto en la oxidasa de la leche como con las deshidrogenasas

purificadas de hígado de mamífero (tabla I), las actividades uricogénicas se duplican aproximadamente, cuando funcionan en presencia de azul de metileno como aceptor inmediato de hidrógeno. En cuanto a las relaciones de actividades que manifiestan frente al NAD⁺ y al azul de metileno (tabla II), se ha comprobado que la eficacia de la deshidrogenasa de cerdo, cuando funciona con el primero de los aceptores, es la mitad aproximadamente que cuando lo hace con el colorante, en lo que se distingue de la deshidrogenasa de ave, cuyos valores respectivos no son tan diferentes, de acuerdo con lo manifestado por MORELL (*loc. cit.*). La xantindeshidrogenasa de la leche, por otra parte, exhibe también una velocidad de reacción bastante menor en presencia de NAD⁺ que en la de azul de metileno (17). Todas estas observaciones parecen indicar la existencia de una acusada similitud entre el enzima de la leche y el hepático de los mamíferos.

El hecho de que en algunos tejidos de las aves el NAD⁺ se encuentre en cantidades sustanciales (hígado de palomo 425, músculo pectoral 580 y riñón 243 $\mu\text{g}/\text{gramo}$ de tejido fresco), inclina a pensar que en la deshidrogenación de la xantina, el dinucleótido puede ser utilizado *in vivo* como transportador electrónico natural (17).

EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE PIRUVATO A LA URICOGÉNESIS CATALIZADA POR LA XANTINDESHIDROGENASA DE HOMOGENADOS DE HÍGADO DE POLLO.

BERNHEIM, LANDON y CARTER, y MORELL (1, 13 y 16) habían observado que el piruvato adicionado a homogenados hepáticos o renales provocaba un incremento en la producción de ácido úrico. Los experimentos reproducidos por nosotros con homogenados de hígado de pollo trabajando en anaerobiosis, confirman lo hallado por dichos autores. Sin embargo, si se estudia el efecto produci-

TABLA III

Efecto de la adición de piruvato a homogenizados de hígado de pollo.

Ensayo	Actividad xantindeshidrogenasa ($\text{U} \times 10^{-3}$)					
	Xantina 3×10^{-3} M		Xantina 3×10^{-4} M		Xantina 3×10^{-5} M	
	a	b	a	b	a	b
Homogenado	0,76	1,03	0,90	1,20	0,76	1,04
Homogenado + piruvato ($1,94 \times 10^{-3}$ M)	1,20	1,60	1,30	1,30	0,76	1,04
Relación de actividades con piruvato sin piruvato	1,6	1,5	1,3	1,06	1,0	1,0

Se realizaron sendos ensayos *a* y *b*, utilizando diferentes glándulas hepáticas de pollo: para ello 0,1 ml de homogenado de hígado de pollo (1:2), se incubaron a 30° y en corriente de nitrógeno. Las concentraciones finales de xantina, así como la de piruvato, son las indicadas en la tabla. En todas las disoluciones se utilizó tampón fosfato de 0,05 M de pH 7,4 como disolvente. El volumen final de las incubaciones fue de 4 ml. A los 30 minutos se adicionó 1 ml de ácido perclórico al 5 % y se determinó el ácido úrico producido.

do a distintas concentraciones de xantina, se observa que no es significativo, cuando su concentración es igual o inferior a 3×10^{-4} M; es decir, el incremento de uricogénesis sólo se hace patente cuando la concentración de xantina se ajusta y no es inferior a la utilizada por MORELL (3×10^{-3} M). (Operando en condiciones aerobias no se observa exaltación alguna por adición de piruvato.)

Para tratar de interpretar los resultados consignados en la tabla III conviene tener en cuenta que a concentraciones 3×10^{-3} M de xantina, la deshidrogenasa se halla parcialmente inhibida por el propio sustrato (12, 19); en estas condiciones puede imaginarse como la adición de piruvato y gracias a las pequeñas cantidades de lacticodeshidrogenasa presentes en el homogenado, resulte exaltada la producción de úrico (véase la aclaración

en el siguiente apartado que se refiere al *Acoplamiento de la xantindeshidrogenasa con otros sistemas*); en cambio, cuando la concentración del sustrato es igual o inferior a 3×10^{-4} M, como que el enzima actúa con su máxima eficacia — sin inhibición —, la incorporación de piruvato no induce exaltación de actividad alguna. Esta interpretación está de acuerdo con el hecho de que experimentando con un preparado purificado de xantindeshidrogenasa — exento de lacticodeshidrogenasa —, la adición de piruvato no provoca incremento alguno de uricogénesis, cualquiera que sea la concentración de xantina presente.

A continuación se describen, por otra parte, los grandes aumentos de producción úrica que se provocan por la incorporación conjunta de piruvato y de lacticodeshidrogenasa a las deshidrogenaciones de la xantina inducidas por preparados purificados — 105 veces concentrados — de xantindeshidrogenasa hepática de pollo.

ACOPLAMIENTO DE LA XANTINDESHIDROGENASA CON OTROS SISTEMAS ENZIMÁTICOS OXIDORREDUCTORES.

Los homogenados crudos de hígado de pollo, cuando se incuban con xantina en condiciones aerobias, muestran una definida actividad *xantinoxidásica*, de la que carece el enzima purificado, según antes se ha indicado — parece tratarse de una deshidrogenasa típica —. Sin embargo, cuando la incubación se hace en medio anaerobio, la actividad de los homogenados se reduce considerablemente, si bien subsiste, durante varias horas, una lenta formación de ácido úrico. Este comportamiento sugiere, de acuerdo con MORELL y LANDON (16, 13), la existencia de algún mecanismo transportador electrónico que podría realizarse a través del NAD^+ presente en los tejidos vivos.

Para estudiar esta posibilidad y teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vitro* por adición de piruvato a los homo-

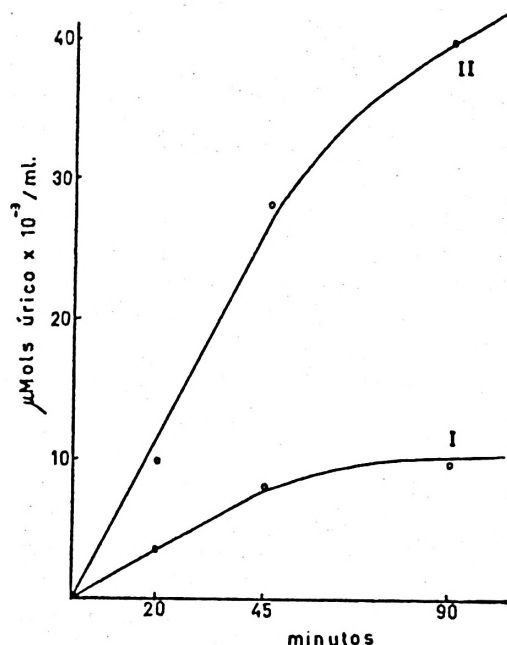


FIG. 1. Efecto del acoplamiento del sistema lacticodeshidrogenásico con el xantindeshidrogenásico. Composición del ensayo: I y II: Xantindeshidrogenasa (XDH) de pollo purificada $1,2 \times 10^{-3}$ U/ml; xantina $7,5 \times 10^{-5}$ M; piruvato $1,9 \times 10^{-3}$ M; NAD^+ $4,7 \times 10^{-5}$ M. El II contiene, además, 2 U/ml de lacticodeshidrogenasa cristalizada de músculo cardíaco de cerdo. Volumen total del incubado: 5,3 ml. Todos los reactivos fueron disueltos en tampón fosfato 0,05 M a pH 7,4 y las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C en corriente de nitrógeno

genados, se plantearon experiencias con los enzimas purificados, en los que podían actuar como aceptores de electrones los sistemas lacticodeshidrogenasa-piruvato y glutamicodeshidrogenasa-oxoglutarato en presencia de pequeñas cantidades de NAD^+ como transportador, pero de suerte que este nucleótido constituyera el factor limitante de la reacción. Los resultados obtenidos utilizando xantindeshidrogenasa de pollo 105 veces purificada, y lacticodeshidrogenasa cristalizada, se expresan en la figura 1: en ella se apre-

cia cómo la presencia de la lacticodeshidrogenasa más piruvato, provoca un considerable aumento de la uricogénesis.

En la tabla IV se expresan los resultados obtenidos al reunir xantindeshidrogenasa hepática de pollo purificada y glutamicodeshidrogenasa, junto con los correspondientes sustratos y cofactores: similarmente que en el anterior experimento (con lacticodeshidrogenasa) resulta un notable incremento de la uricogénesis. Parece fuera de duda por tanto, que gracias al acoplamiento de los sistemas enzimáticos, el piruvato y el α -oxoglutarato actúan como aceptores finales de los electrones procedentes de la base púrica (xantina).

En la tabla V se consignan los resultados obtenidos operando con xantindeshidrogenasa hepática purificada de cerdo.

En la figura 1 y en las tablas IV y V, se observan los incrementos de biosíntesis úrica provocados tanto por la incor-

TABLA IV

Acoplamiento de la GDH con la XDH purificada de hígado de pollo.

Composición de los incubados	Actividad U/ml	Relación de actividades
XDH, xantina, NAD^+ , CINH_2 , y α -oxoglutarato	$5,22 \times 10^{-3}$	—
XDH, xantina, NAD^+ , CINH_2 , α -oxoglutarato, y GDH	$9,01 \times 10^{-3}$	1,7

Xantindeshidrogenasa hepática de pollo purificada: $5,4 \times 10^{-3}$ U/ml; glutamicodeshidrogenasa $2,8 \times 10^{-1}$ U/ml; xantina $7,5 \times 10^{-5}$ M; NAD^+ $4,7 \times 10^{-5}$ M; α -oxoglutarato 3×10^{-3} M. La incubación se prolongó durante 30 minutos a 30° . Todos los reactivos se emplearon disueltos en tampón fosfato 0,05 M de pH 7,4.

TABLA V

Acoplamiento de la LDH y GDH con la XDH purificada de hígado de cerdo.

Composición de los incubados	Actividad U/ml	Relación de actividades
XDH, xantina, piruvato, NAD^+	$5,4 \times 10^{-3}$	—
XDH, xantina, piruvato, NAD^+ , LDH	$14,4 \times 10^{-3}$	2,6
XDH, xantina, α -oxoglutarato, NAD^+ , NH_4^+	$4,8 \times 10^{-3}$	—
XDH, xantina, α -oxoglutarato, NAD^+ , NH_4^+ , GDH ..	$16,2 \times 10^{-3}$	3,3

Xantindeshidrogenasa (XDH) purificada de hígado de cerdo: $1,02 \times 10^{-2}$ U/ml; lacticodeshidrogenasa (LDH) cristalizada de corazón de cerdo: 0,8 U/ml; glutamicodeshidrogenasa (GDH) cristalizada de hígado bovino: 0,2 U/ml; xantina $7,5 \times 10^{-5}$ M; piruvato sódico $1,9 \times 10^{-2}$ M; α -oxoglutarato sódico 3×10^{-2} M; NAD^+ $4,5 \times 10^{-3}$ M; CINH 0,15 M. Todos los reactivos disueltos de tampón fosfato 0,05 M de pH 7,4; volumen total de los líquidos de incubación: 5,3 ml. Incubación durante 120 minutos a 30° y en corriente de nitrógeno.

poración de lacticodeshidrogenasa como por la de glutamicodeshidrogenasa. Ambos sistemas enzimáticos se acoplan a través del NAD^+ con el xantindeshidrogenásico y la mayor o menor producción de úrico viene condicionada, en último término, por las cantidades disponibles de piruvato o de α -oxoglutarato. Estos mecanismos, que fueron sugeridos por algunos autores (13, 16), que operaron con homogenados de hígado o riñón de ave, hemos podido confirmarlos, generalizándolos a la xantindeshidrogenasa porcina (tabla V), si bien la velocidad uricogénica observada en este caso es sensiblemente inferior (alrededor de un 50 % menos, que la xantindeshidrogenasa de ave); probablemente, esto se debe a la menor eficacia reductora del NAD^+ (tabla II) exhibida por la xantindeshidrogenasa de cerdo. De todas estas observaciones parece poder intuirse la probabilidad de que

el sistema lacticodeshidrogenásico (y el glutamicodeshidrogenásico) actúen *in vivo* como reguladores de la actividad uricogénica del hígado, cuya magnitud dependería, por tanto, de las disponibilidades del ácido pirúvico de origen glucolítico. Este mecanismo, que puede tener un verdadero sentido fisiológico en el riñón de las aves, según LANDON y CARTER (13), seguramente represente un papel más secundario en los mamíferos, dada la menor capacidad observada de su enzima hepático, reductora del NAD^+ ; por otra parte, esta deshidrogenasa aerobia posee la capacidad de utilizar directamente al oxígeno molecular como aceptor electrónico. No obstante, es posible que tanto en las aves como en los mamíferos, el proceso de acoplamiento anaerobio indicado constituya un mecanismo predominante durante el esfuerzo muscular, precisamente cuando la respiración es incapaz de suministrar suficiente NAD^+ .

ACCIONES DEL ÁCIDO SALICÍLICO, DE LA FENILBUTAZONA Y DE LA COLCHICINA SOBRE LA LÁCTICO- Y LA GLUTÁMICO-DESHIDROGENASA.

Se ha determinado la actividad de la lacticodeshidrogenasa y de la glutamicodeshidrogenasa en presencia de algunos fármacos antigotosos o antirreumáticos (tabla VI). En los ensayos con fenilbutazona o con ácido salicílico se ha utilizado como método analítico, el espectrofotométrico y para los ensayos con colchicina se adaptó el método de FRIEDEMANN y HAUGEN de determinación de oxoácidos (descritos en Métodos).

Las marcadas diferencias de poder inhibidor de los tres fármacos sobre cada una de las deshidrogenasas (LDH y GDH), contrasta con sus comunes acciones inhibitoras sobre la XDH [MARTÍNESTEVE, BOZAL y CALVET (15), y RAMIA, BOZAL y CALVET (19)]. El ácido salicílico muestra un ligero poder inhibidor sobre la LDH, indicado también por otros au-

TABLA VI
Acciones inhibitoras de algunos fármacos
sobre la lacticodeshidrogenasa y la
glutamicodeshidrogenasa.

Ensayo		Deshidrogenasa ensayada		Inhibición (%)	
		LDH: U $\times 10^{-3}$ /ml liquido incubacion valor hallado	GDH: U $\times 10^{-3}$ /ml liquido incubacion valor hallado	de la LDH	de la GDH
1	Testigo	1,6	1,4	—	—
	Acido salicilico $5,4 \times 10^{-3}$ M	1,5	1,4	6,3	0,0
2	Testigo	3,3	1,2	—	—
	Fenilbutazona $1,8 \times 10^{-3}$ M	2,6	0,74	20,0	38,0
	Fenilbutazona $5,4 \times 10^{-3}$ M	1,5	0,27	54,6	78,0
3	Testigo	1,7	1,62	—	—
	Colchicina $5,6 \times 10^{-3}$ M	0,61	1,62	64,0	0,0
	Colchicina $8,0 \times 10^{-3}$ M	0,08	1,62	96,0	0,0

Ensayos 1 y 2: Lacticodeshidrogenasa (LDH) aproximadamente 0,45 U en el total incubado (*); piruvato 3×10^{-4} M; NAD $^{+}$ $1,2 \times 10^{-4}$ M. Acido salicílico (ver tabla); tampón fosfato 0,05 M, pH 7,4; volumen total incubado: 3 ml.

Glutamicodeshidrogenasa (GDH) aproximadamente 0,03 U (*); α -oxoglutarato $1,1 \times 10^{-3}$ M; CINH $_4$ 0,15 M; fenilbutazona (ver tabla); tampón fosfato 0,05 M, pH 7,4; volumen total 3 ml.

Ensayo 3: Lácticodeshidrogenasa (LDH) aproximadamente 0,09 U (*); piruvato $5,7 \times 10^{-4}$ M; NAD $^{+}$ $0,7 \times 10^{-4}$ M; colchicina (ver tabla); tampón fosfato 0,05 M, pH 7,4; volumen total, 3,5 ml.

Glutamicodeshidrogenasa (GDH) aproximadamente 0,05 U (*); oxoglutarato $5,6 \times 10^{-4}$ M; NAD $^{+}$ $0,7 \times 10^{-4}$ M; colchicina (ver tabla); volumen total 3,5 ml.

Para la determinación de las actividades LDH y GDH se incubaron las mezclas a 30° y en corriente de nitrógeno. A los 1, 3 y 7 minutos se tomaron muestras de 1 ml y se vertieron sobre sendos 1 ml de ácido tricloroacético al 50 %. Después de centrifugar se determinaron los correspondientes α -oxoácidos.

tores (10, 11), pero no ejerce acción sobre la GDH. La fenilbutazona inhibe claramente ambas deshidrogenasas y finalmente la colchicina inhibe fuertemente a la lacticodeshidrogenasa. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio [MARÍN, MARTÍN-ESTEVE, CALVET (14) y RAMIA, BOZAL, CALVET (19)], se formuló la hipótesis de que la beneficiosa acción terapéutica de los anteriores fármacos podría estar relacionada con su poder inhibitor de la XDH. Pensamos ahora que los resultados obtenidos con la colchicina y la fenilbutazona sobre la láctico- y glutámico-deshidrogenasa, enzimas ambos acoplables a la XDH, ponen de manifiesto que en el marcado poder inhibitor exhibido por dichos fármacos sobre la uricogénesis global *in vitro* de los homogenados hepáticos, se suman las acciones inhibitoras que ejercen separadamente sobre cada uno de los sistemas acoplados.

Resumen

La reacción enzimática de formación de ácido úrico por la xantindeshidrogenasa implica un trasiego electrónico desde el sustrato hacia un aceptor inmediato que, para el enzima hepático o renal de las aves, puede ser el NAD $^{+}$ celular.

En este Trabajo se estudian las velocidades de la deshidrogenación de la xantina, catalizada por la xantindeshidrogenasa de hígado de mamífero (porcina y humana) en presencia de varios aceptores, comparándolas con las exhibidas por el enzima hepático de ave. Se ha obtenido una relación de velocidades

* Estas unidades de actividad enzimática son las obtenidas por aplicación del método de REEVES y FIMOGNARI (20) para la lacticodeshidrogenasa, y de GERLACH (8) para la glutamicodeshidrogenasa. Por otra parte, las actividades de dichos enzimas en la tabla VI se refieren a las obtenidas por adaptación de dichos métodos a nuestras condiciones experimentales, tal como se describe en Material y métodos.

O_2 /Azul de metileno = 0,5 y NAD^+ /Azul de metileno = 0,44; el último cociente relativo a la xantindeshidrogenasa de pollo es igual a 0,78. De la comparación de estos valores se deduce que el NAD^+ no es tan buen aceptor electrónico inmediato para la xantindeshidrogenasa de mamífero como para la de ave. Por estar el NAD^+ normalmente ligado a otros sistemas óxido-reductores, la deshidrogenación de la xantina puede, en suma, depender de aceptores más remotos; nosotros hemos observado, de acuerdo con la hipótesis de MORELL (16), que *in vitro* ellos pueden ser, entre otros, el ácido pirúvico y el ácido α -oxoglutarico, gracias al concurso de las respectivas deshidrogenasas láctica y glutámica; estos resultados se han comprobado tanto con la xantindeshidrogenasa de ave como con la de mamífero.

Summary

Hepatic Xanthinedehydrogenase. II. Acceptors of Electrons Coupled Enzymatically

The formation of uric acid from xanthine by the action of a xanthinedehydrogenase implies an electronic transfer from the substrate to an immediate acceptor, which, in the cases of bird hepatic or renal enzymes, can be the cellular NAD^+ .

In this paper, the enzymatic dehydrogenation of xanthine by human and porcine liver dehydrogenases has been studied in the presence of different electron acceptors. Although NAD^+ appears to be a less efficient acceptor for mammalian xanthinedehydrogenases than for the chicken hepatic enzyme, the dinucleotide can effectively bridge the electron current towards pyruvic acid or α -oxoglutaric acid when either lacticdehydrogenase or glutamicdehydrogenase are also present. The coupling of xanthinedehydrogenase with the lactic- (or glutamic-) dehydrogenase systems brings about a significant increase in the uric acid production. These phenomena have been observed with both pig liver and chicken liver xanthinedehydrogenases.

It has been previously shown that salicylic acid, phenylbutazone and colchicine are powerful inhibitors of hepatic xanthinedehydrogenases. Now we have found that although salicylic slightly inhibits lacticdehydrogenase, phenylbutazone is a vigorous inhibitor of both lactic- and glutamic-dehydrogenases, whereas colchicine induces a strong inhibition of lacticdehydrogenase only. It is suggested that the inhibiting properties of the said drugs may be intimately related with the therapeutical effects attained when they are administered for the treatment of gout and similar diseases, imputed to an exalted uricogenesis.

Bibliografía

1. BERNHEIM, F. y BERNHEIM, M. L. C.: *Arch. Biochem.*, **12**, 249, 1947.
2. BROWN, H.: *J. Biol. Chem.*, **158**, 610, 1945.
3. CARRASCO, E., MARTÍN-ESTEVE, J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **24**, 193, 1968.
4. DIETRICH, L. S.: *J. Biol. Chem.*, **211**, 79, 1954.
5. DOMINGO, E., BOZAL, J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **23**, 145, 1967.
6. FEIGELSON, P.: *Science*, **120**, 502, 1954.
7. FRIEDEMANN, T. E. y HAUGEN, G. E.: *J. Biol. Chem.*, **147**, 415, 1943.
8. GERLACH, U.: *Klin. Wschr.*, **35**, 1144, 1957.
9. GORNALL, A. G., BORDAWILL, C. S. y DAVID, M. M.: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751, 1949.
10. GUOLD, B. J., HUGGINS, A. K. y SMITH, J. H.: *Biochem. J.*, **88**, 346, 1963.
11. HINES, W. J. W.: *Nature*, **201**, 192, 1954.
12. HOFSTEE, B. H.: *J. Biol. Chem.*, **216**, 235, 1955.
13. LANDON, E. J. y CARTER, CH. E.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 819, 1960.
14. MARÍN, A., MARTÍN-ESTEVE, J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **20**, 165, 1964.
15. MARTÍN-ESTEVE, J., BOZAL, J. y CALVET, F.: *Arch. Inter. Rheumatol.*, **7**, 456, 1964.
16. MORELL, D. B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 258, 1955.

17. MORELL, D. B.: *Biachim. Biophys. Acta*, 18, 221, 1955.
18. RAJAGOPALAN, K. U. y HANDLER, P.: *J. Biol. Chem.*, 242, 4097, 1967.
19. RAMIA, J., BOZAL, J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, 22, 85, 1966.
20. REEVES, W. J. y FIMOGNARI, G. M.: WELLS, J. C. y WESTERFELD, W. W.: *J. Biol. Chem.*, 238, 3853, 1963.
21. REMY, C., RICHERT, D. A., DOISY, R. J., WELLS, J. C. y WESTERFELD, W. W.: *J. Biol. Chem.*, 217, 293, 1955.