

Estudios cinéticos sobre la xantindeshidrogenasa hepática. II. Inhibición por algunas purinas

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

Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad. Barcelona

(Recibido el 16 de julio de 1969)

É. DOMINGO, J. BOZAL and F. CALVET, *Kinetic Studies on Hepatic Xanthine Dehydrogenase. II. Inhibition by Some Purines*. R. esp. Fisiol., 26, 9-20, 1970.

Adenine and purine behave as reversible inhibitors of chicken liver xanthine dehydrogenase. Purine inhibits competitively the Xanthine-Xanthine dehydrogenase-NAD system; however, when the NAD concentration is low, the inhibition induced by adenine shows to be non-competitive. Operating with NAD as the variable substrate and with xanthine as the fixed one, adenine behaves as a non-competitive inhibitor of the dehydrogenase. When the enzyme is also inhibited by one of its own substrates — xanthine or hypoxanthine —, purine and adenine appear to satisfy the general kinetics typical of competitive inhibitors upon a system already inhibited by substrate. Urea inhibits xanthine dehydrogenase in a less effective way, although the mechanism is apparently similar to the one exhibited by adenine. Adenine also inhibits competitively the Xanthine-Xanthine dehydrogenase-DCI system, and non-competitively when reduced NAD — instead of xanthine — is used as the electron donor.

The preceding observations suggest that all purines must compete for the same active center of the dehydrogenase oxidized form. Adenine also seems to partially combine with the free enzyme reduced form that is produced during the catalytical redox reaction.

Salicylate inhibits competitively the Xanthine-Xanthine dehydrogenase-NAD or DCI systems and uncompetitively the reduced NAD-Xanthine dehydrogenase-DCI system. This behaviour of xanthine dehydrogenase induced by salicylate shows to be different from that of most of the hitherto studied dehydrogenases.

Nuestro estudio previo de las velocidades de la reacción metabólica catalizada por la xantindeshidrogenasa hepática de pollo, empleando xantina y NAD como sustratos, reveló la existencia de una etapa irreversible entre los instantes de adición de cada uno de dichos sustratos al enzima (9). Trabajando con concentraciones de xantina superiores a 1×10^{-4} M, la xantindeshidrogenasa resulta inhibida por sus sustratos naturales, la xantina y la hipoxantina, fenómeno ya puesto de manifiesto anteriormente (8, 14) mediante

experiencias realizadas en condiciones aerobias y empleando azul de metileno como transportador electrónico. La aplicación del método cinético de DALZIEL (6) al análisis de las inhibiciones por sustrato mostró que la xantindeshidrogenasa hepática de pollo experimenta una inhibición de tipo no competitivo (9). Consecuentemente, la concentración del aceptor electrónico fisiológico NAD (10) modifica con-

* Becario de la Fundación Juan March, 1966.

siderablemente la magnitud de la mencionada inhibición por el sustrato. Como quiera que la xantina se halla presente en el hígado de muchos animales — también en el del hombre — en concentraciones sustanciales (2) — superiores a los valores de las K_m halladas para los respectivos enzimas — se sugiere que la acción inhibidora del propio sustrato puede contribuir a mantener en la glándula animal una uricogénesis limitada.

Habida cuenta de las anteriores consideraciones, se juzgó interesante estudiar también las influencias de otras bases púricas sobre la actividad de la xantindeshidrogenasa, y comenzando por la adenina se observó actuaba como inhibidora del enzima (8, 17).

El objeto del presente trabajo consiste en el estudio cinético de la influencia ejercida por las bases purina y adenina, sobre la actividad de la xantindeshidrogenasa, incluido el caso de que el enzima se halle inhibido, además, por sus propios sustratos fisiológicos — la xantina o la hipoxantina —. Se han aplicado también los métodos cinéticos adecuados a la investigación de la inhibición de la xantindeshidrogenasa por el ácido salicílico — ya observada anteriormente en nuestro Departamento (14) —, el cual se ha sugerido inhibe en general a las deshidrogenasas por competencia con el NAD, con el NADP o con sus respectivas formas reducidas (7, 11).

Material y métodos

Como material enzimático se empleó un preparado de xantindeshidrogenasa de pollo, purificado a partir de homogenados hepáticos frescos, según las técnicas de tratamiento térmico y de fraccionamiento con sulfato amónico descritas por WESTERFELD (15) y adaptadas por CARRASCO en nuestro laboratorio (1). Su actividad específica establecida con xantina y azul de metileno era 11,5 U.I.

Las velocidades iniciales de reacción se

determinaron espectrofotométricamente (Beckman D.U.) midiendo los incrementos de densidad óptica experimentados a $340\text{ m}\mu$ al emplear NAD como aceptor electrónico — en los ensayos con ácido salicílico se operó a $365\text{ m}\mu$ — y a $600\text{ m}\mu$ al utilizar 2,6-diclorofenolindofenol (DCI) como aceptor. Las velocidades se han expresado, en todos los casos, mediante los $\Delta\text{D.O.}/\text{min}$. Los ensayos se efectuaron a 30° C , en tampón fosfatos de $\text{pH} = 7,4$ (0,05 M). Las experiencias de diálisis de los preparados enzimáticos se practicaron frente al tampón mencionado a la temperatura de 5° C .

Expresión de resultados. Dado que los sistemas enzimáticos que nos ocupan son birreactantes, del tipo sustrato (donador electrónico) — xantindeshidrogenasa — otro sustrato (aceptor), resultan aplicables los métodos cinéticos desarrollados por CLELAND (4, 5) para la caracterización de las inhibiciones, que se clasifican como competitivas, no competitivas o incompetitivas, de acuerdo con las definiciones propuestas por dicho autor (4). Los valores de las constantes de inhibición se han establecido previa comprobación del carácter rectilíneo de las inhibiciones, construyendo las correspondientes gráficas secundarias de los valores de las pendientes en función de las concentraciones de inhibidor, y de las intersecciones de las representaciones de Lineweaver-Burk, también en función de las concentraciones de inhibidor.

Resultados

ACCIONES INHIBIDORAS DE LA PURINA Y DE LA ADENINA SOBRE LA XANTINDESHIDROGENASA. Los experimentos publicados en un trabajo anterior (9) pusieron de relieve que la purina se comporta como sustrato de la xantindeshidrogenasa hepática de pollo, en tanto que la adenina prácticamente no provoca reducción alguna del NAD en presencia del enzima. En cambio,

ambas bases actúan como efectivas inhibidoras de la deshidrogenasa. La reversibilidad de las inhibiciones se comprobó mediante experimentos de diálisis y de dilución — eliminación o reducción de la concentración del inhibidor —. Las muestras del enzima adicionadas de adenina o de purina (3×10^{-3} M) se mantuvieron durante 30 minutos a 20° C, antes de proceder a su dilución o diálisis. Las actividades enzimáticas de las mezclas — establecidas empleando xantina (6×10^{-5} M y $1,2 \times 10^{-4}$ M) y NAD ($1,2 \times 10^{-3}$ M) como sustratos — se compararon en cada caso con las de otras muestras de enzima no tratadas con los inhibidores, pero sometidas a las mismas vicisitudes que aquéllas. Los resultados permiten concluir que la adenina y la purina se comportan como inhibidores reversibles de la xantindeshidrogenasa hepática de pollo (tabla I).

Tabla I. *Reversibilidad de las inhibiciones de la xantindeshidrogenasa inducidas por la adenina y purina.*

En los ensayos efectuados antes de la diálisis y sin dilución, las concentraciones finales de adenina y purina eran de 6×10^{-4} y 5×10^{-4} M, respectivamente.

Adiciones al Enzima	Actividad* con Xantina	
	6×10^{-5} M	$1,2 \times 10^{-4}$ M
—	0,290	0,336
Adenina	0,093	0,133
Purina	0,083	0,116
<u>Dilución 1:2</u>		
—	0,156	0,200
Adenina	0,083	0,111
Purina	0,053	0,083
<u>Dilución 1:8</u>		
—	0,035	0,041
Adenina	0,035	0,045
Purina	0,034	0,040
<u>Diálisis 48 h.</u>		
—	0,296	0,298
Adenina	0,276	0,293
Purina	0,236	0,236

* A D.O. $\times 10/\text{min.}$

INHIBICIÓN POR LA PURINA. La inhibición del sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD por la purina se ha estudiado empleando una concentración constante de NAD ($1,2 \times 10^{-3}$ M) y concentraciones variables de xantina. Los experimentos se han realizado despreciando la pequeña capacidad de la purina para actuar como sustrato — la velocidad de su deshidrogenación enzimática es minúscula en nuestras condiciones operatorias, i. e., concentraciones de purina y de enzima utilizadas (9).

Los resultados (fig. 1) indican que la inhibición es de tipo competitivo, con un valor de $K_i = 3,3 \times 10^{-5}$ M. Las desviaciones del carácter rectilíneo de las representaciones de Lineweaver-Burk que se observan al emplear concentraciones de xantina elevadas ($> 1 \times 10^{-4}$ M) se deben a la inhibición ejercida por el propio sustrato, descrita previamente en un trabajo anterior (9). La velocidad máxima real que puede alcanzar la reacción enzimática — mínimo de las curvas — se obtiene con concentraciones tanto más elevadas del sustrato xantina cuanto mayor es la del inhibidor presente. Este comportamiento es típico de los inhibidores competitivos de un sistema enzimático que presenta, además, inhibición por el propio sustrato (18).

La purina también inhibe competitivamente al sistema hipoxantina-xantindeshidrogenasa-NAD ($1,2 \times 10^{-3}$ M), siendo la $K_i = 3,5 \times 10^{-5}$ M. Nuestros resultados ponen de relieve, también, la disminución de la velocidad máxima alcanzable por la reacción inhibida por el sustrato hipoxantina en presencia de purina 1×10^{-4} M y 2×10^{-4} M (fig. 2).

Estos fenómenos armonizan perfectamente con los previamente observados al operar con mezclas de sustratos purínicos (9), indicadores de que las transformaciones de las distintas bases hipoxantina, xantina y purina tiene lugar en un mismo centro activo del enzima.

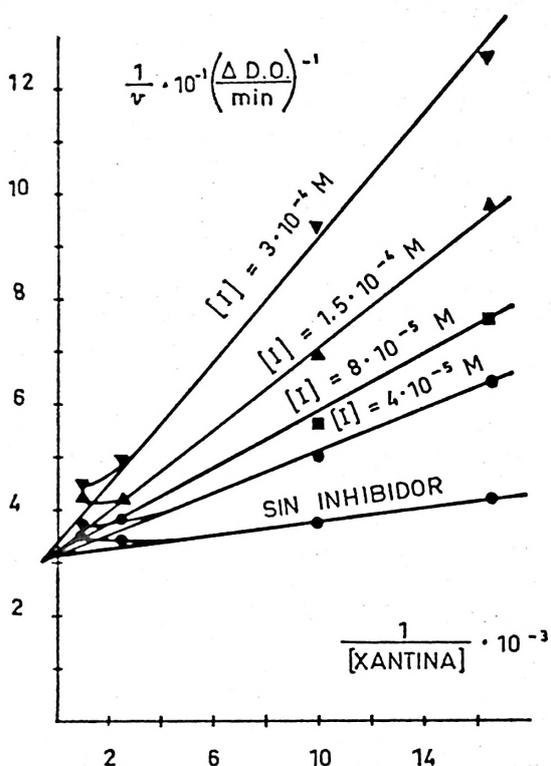


Fig. 1. Inhibición de la xantindeshidrogenasa por la purina ($[NAD] = 1,2 \times 10^{-3} M$).

INHIBICIÓN POR LA ADENINA. La acción de la adenina sobre la xantindeshidrogenasa hepática se ha ensayado empleando sucesivamente el NAD y el DCI como aceptores electrónicos.

INHIBICIÓN DEL SISTEMA XANTINA-XANTINDESHIDROGENASA-NAD. La acción inhibitoria de la adenina se ha estudiado con xantina como sustrato variable y NAD a concentración constante, y también con NAD como sustrato variable, manteniendo entonces constante la concentración xantínica (fig. 3). Con el NAD, a concentración constante $1,2 \times 10^{-3} M$, la inhibición ejercida por la adenina es de tipo competitivo, siendo la $K_i = 5,2 \times 10^{-5} M$. Empleando una menor concentración constante de NAD, $4 \times 10^{-5} M$, la inhibición se manifestó como no competitiva, con

una K_i (intersección) $= 2,6 \times 10^{-4} M$ y una K_i (pendiente) $= 1,4 \times 10^{-5} M$.

El hecho de que al disminuir la concentración de NAD aparezca, en las representaciones de Lineweaver-Burk correspondientes a las distintas concentraciones de adenina, una variación en el valor de las intersecciones sobre el eje $1/v$, parece indicar que dicha base se debe combinar también, parcialmente, con la forma reducida del enzima libre; en cambio, las concentraciones elevadas de NAD tienden a impedir la formación de dicha combinación, asegurando así la inhibición típicamente competitiva con respecto a la xantina, que antes se ha descrito.

En una serie de ensayos posterior se estudió la acción inhibitoria empleando concentraciones variables de NAD y constante de xantina ($1 \times 10^{-4} M$). Los valores obtenidos (fig. 4), indican se trata de inhibición no competitiva, con K_i (intersección) $= 1,3 \times 10^{-4} M$ y K_i (pendiente) $= 3,7 \times 10^{-5} M$. Este resultado sugiere también que la adenina se combina con las dos formas del enzima libre — la oxi-

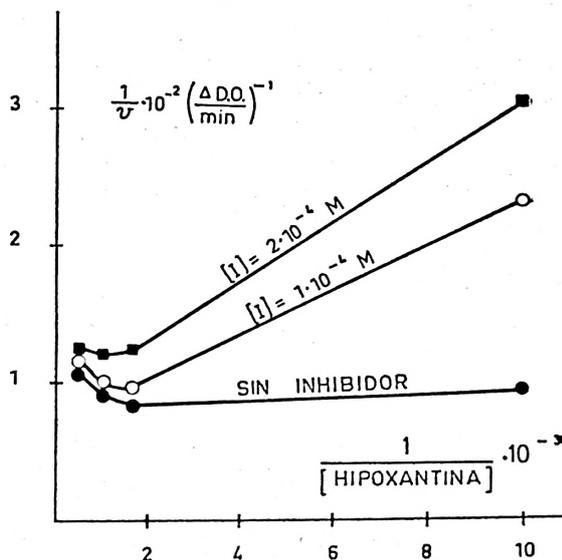


Fig. 2. Acción de la purina sobre la xantindeshidrogenasa inhibida por exceso de hipoxantina ($[NAD] = 1,2 \times 10^{-3} M$).

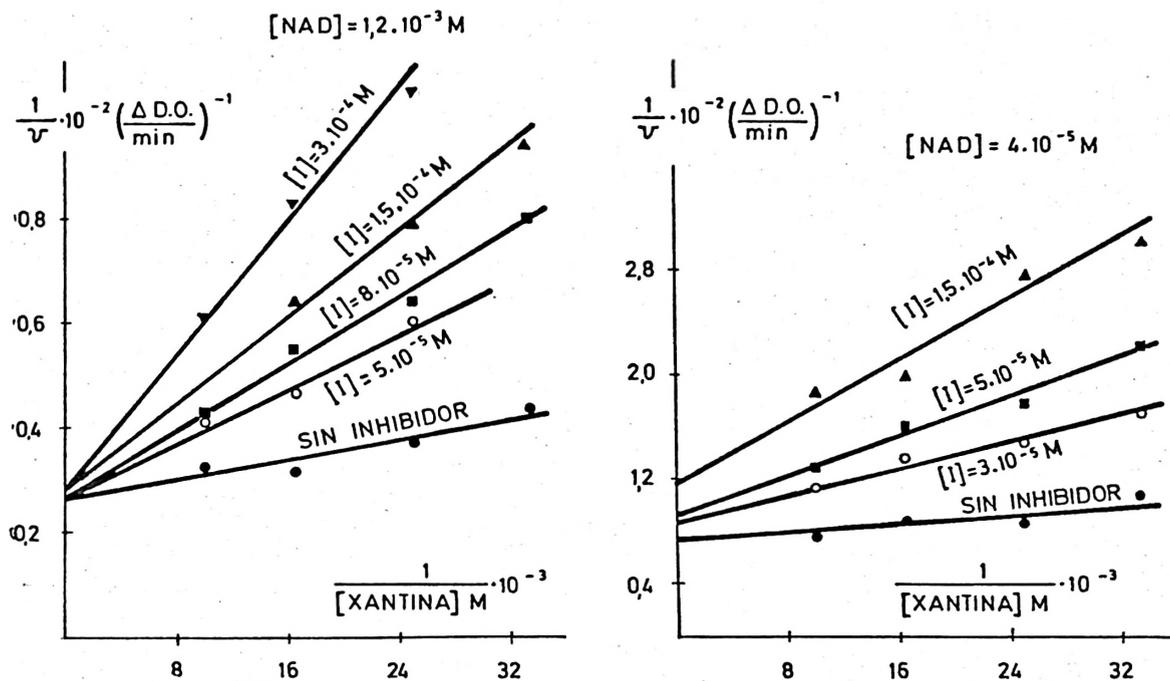


Fig. 3. Inhibición por la adenina del sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD.

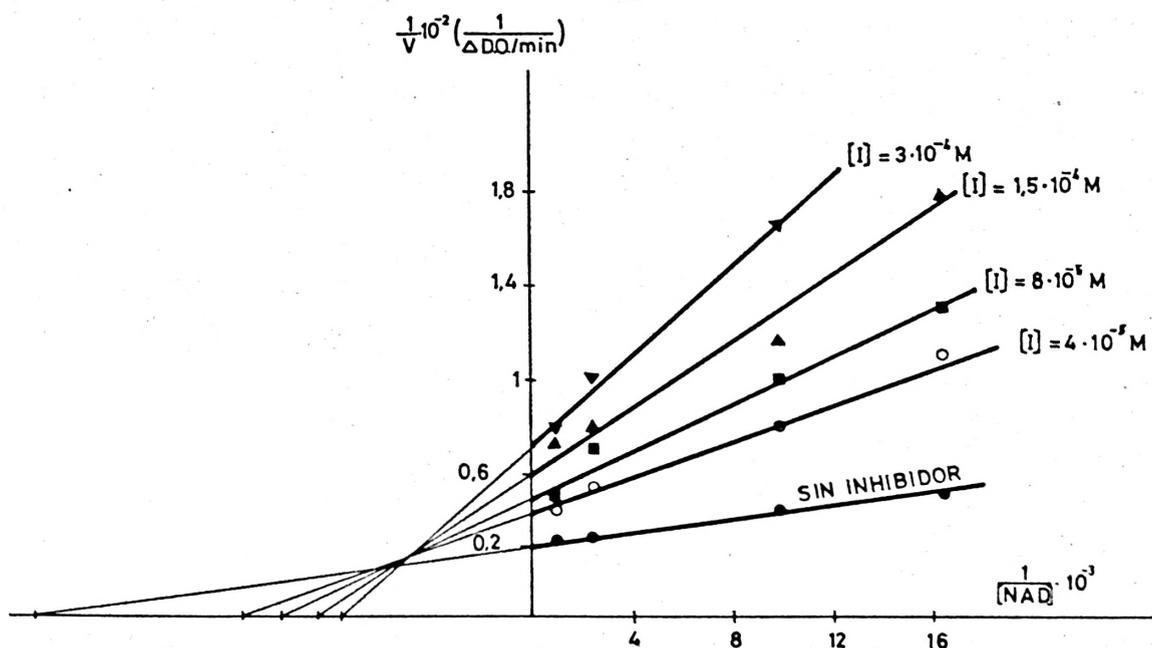


Fig. 4. Inhibición de la xantindeshidrogenasa por la adenina ($[xantina] = 10^{-4} M$).

dada y la reducida — ambas presentes al actuar el enzima según un mecanismo ping-pong (3, 9).

INHIBICIÓN POR LA ADENINA DEL SISTEMA INHIBIDO POR EL SUSTRATO. Al actuar la adenina como inhibidor del sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD ($1,2 \times 10^{-3}$ M) cuando lo hace en condiciones de inhibición por el propio sustrato —xantina $> 10^{-4}$ M o hipoxantina $> 10^{-4}$ M— se observa análogamente que en el caso de la purina un desplazamiento del máximo de la velocidad de reacción inhibida por el sustrato, hacia concentraciones más elevadas del mismo (18), esto es, se establece una competencia entre la xantina o la hipoxantina y la adenina (figura 5 a).

INHIBICIÓN DEL SISTEMA XANTINA-XANTINDESHIDROGENASA-DCI. También se ha investigado la acción inhibidora de la adenina frente a concentraciones variables de xantina, empleando DCI ($3,5 \times 10^{-5}$ M) como aceptor electrónico (fig. 5 b). La

constante de Michaelis aparente para el sistema xantina-xantindeshidrogenasa-DCI ($3,5 \times 10^{-5}$ M, es 1×10^{-5} M. Introducida la adenina en dicho sistema, se comporta como un inhibidor competitivo, siendo $K_i = 1,8 \times 10^{-4}$ M.

La observación realizada sugiere que la adenina compite con la xantina por un mismo centro activo de la forma oxidada de la xantindeshidrogenasa.

INHIBICIÓN POR LA UREA DEL SISTEMA XANTINA-XANTINDESHIDROGENASA-NAD. La acción inhibidora de la urea ha sido caracterizada por nosotros empleando concentraciones variables de xantina y constantes de NAD, y también cuando el NAD actúa como sustrato variable (fig. 6).

Las experiencias realizadas con una concentración de NAD constante $1,2 \times 10^{-3}$ M mostraron que la inhibición ejercida por la urea es de naturaleza competitiva ($K_i = 0,25$ M). Cuando la concentración del sustrato NAD es 4×10^{-5} M (constante), la inhibición resulta ser de tipo no competitivo, con una K_i (intersección) =

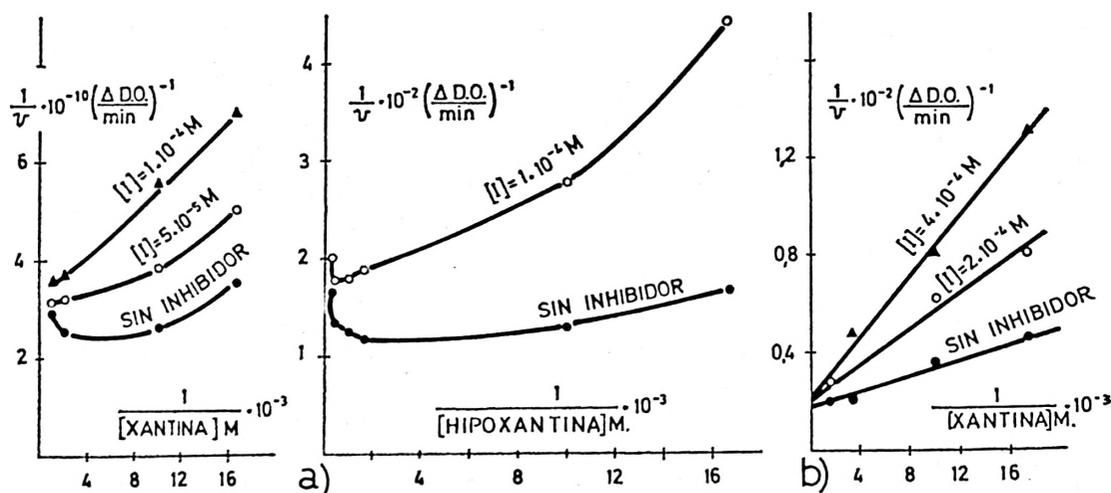


Fig. 5. Inhibición por la adenina del sistema inhibido por el sustrato. a) Inhibición por la adenina de la xantindeshidrogenasa inhibida por sus sustratos ($[NAD] = 1,2 \times 10^{-3}$). b) Inhibición por la adenina del sistema xantina-xantindeshidrogenasa-DCI.

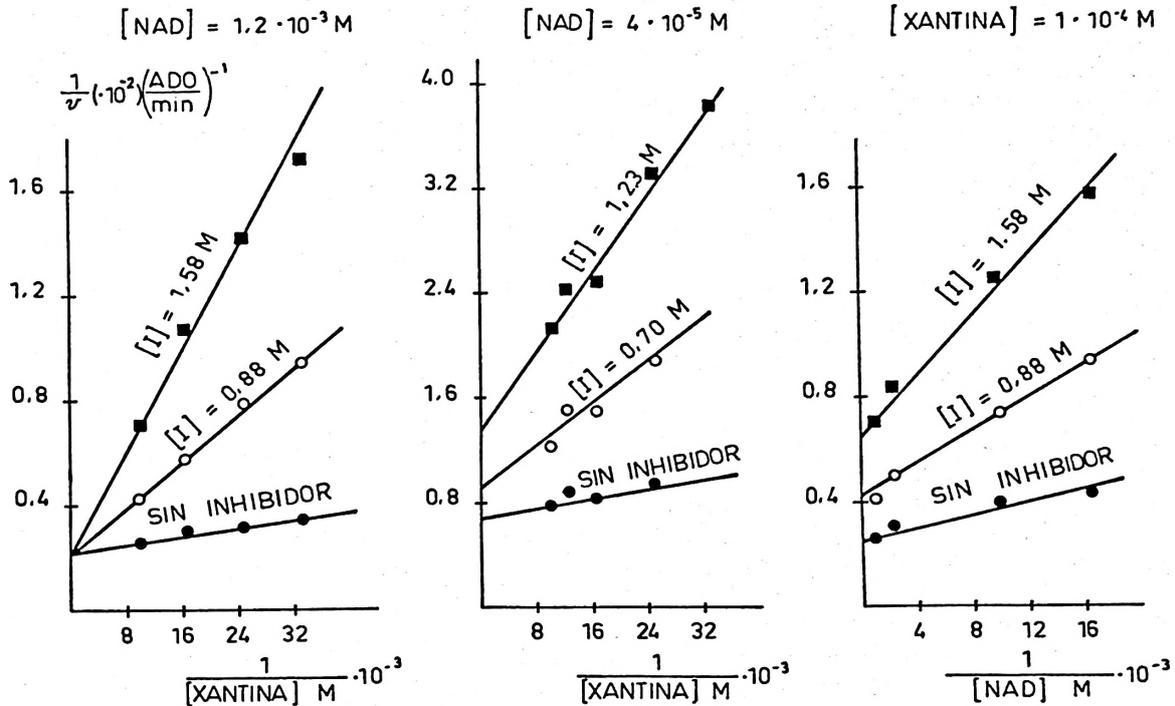


Fig. 6. Acción inhibitoria de la urea sobre el sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD.

1,3 M y una K_i (pendiente) = 0,13 M. La inhibición ejercida por la urea, con relación al NAD como sustrato variable, y empleando xantina a concentración constante, es también no competitiva, obteniéndose los valores siguientes: K_i (intersección) = 1,0 M y K_i (pendiente) = 0,49 M.

Los resultados sugieren que los mecanismos de interacción de la urea con la xantindeshidrogenasa son análogos a los que tienen lugar en la inhibición inducida por la adenina —aunque la manifestada por la urea sea menos potente.

INHIBICIÓN POR LA PURINA Y LA ADENINA DE LA ACTIVIDAD DESHIDROGENÁSICA FRENTE AL NAD REDUCIDO. El preparado purificado de xantindeshidrogenasa que hemos utilizado muestra actividad deshidrogenásica sobre el NAD reducido, empleando DCI como aceptor. La velocidad de reducción del DCI ($3,5 \times 10^{-5}$ M) obte-

nida operando con NAD reducido (4×10^{-5} M) fue $12,1 \times 10^{-2}$ Δ D.O./min., mientras que, en análogas condiciones, y con la misma concentración de xantina, la velocidad resultó ser solamente $6,75 \times 10^{-2}$ Δ D.O./min.

La purina ejerce una débil acción inhibitoria sobre la actividad deshidrogenásica frente al NAD reducido, y la incubación previa del preparado enzimático con la purina a 30° C durante una hora no induce variación notable alguna de su poder inhibitorio efectivo.

La comparación de los valores numéricos de la Tabla II muestra que la inhibición por la purina, notable cuando el sustrato operante es xantina, se manifiesta como considerablemente inferior al utilizar NAD reducido.

La adenina, en cambio, constituye un potente inhibidor de la actividad deshidrogenásica frente al NAD reducido. Los re-

Tabla II. Inhibición por purina de la xantina-deshidrogenasa (DCI $3,5 \times 10^{-5}$ M).

	[Purina] M	v. (10 ²) min.	$\frac{\Delta D.O.}{\text{min.}}$	Inhib. %
NAD reducido				
4×10^{-5} M	—	9,23		
4×10^{-5} M	2×10^{-3}	7,80		15
Xantina				
4×10^{-5} M	—	7,30		
4×10^{-5} M	2×10^{-3}	0,43		94

sultados indican que la inhibición es de tipo acompetitivo (fig. 7). Empleando DCI $3,5 \times 10^{-5}$ M, el valor de la constante aparente de Michaelis que hemos hallado es $K_m = 5,1 \times 10^{-6}$ M y la constante de inhibición para la adenina es $K_i = 2,9 \times 10^{-4}$ moles.

Este fenómeno sugiere que la adenina se debe ensamblar al enzima por un centro de unión distinto al que lo hace el sustrato NAD reducido; la observación es concordante con las de otros autores, quienes, trabajando con xantindeshidrogenasa altamente purificada, asignan al enzima un centro activo de deshidrogenación del NAD reducido distinto del que entra en juego al deshidrogenarse la xantina (13).

El conjunto de experimentos de inhibición que preceden indican que existe una efectiva concurrencia, entre las distintas bases púricas, por unos mismos centros de actividad catalítica de la xantindeshidrogenasa.

CONTRIBUCIÓN A LA CINÉTICA DE LOS MECANISMOS DE ACTUACIÓN DE LOS ÁCIDOS SALICÍLICO Y ACETILSALICÍLICO SOBRE LA XANTINDESHIDROGENASA HEPÁTICA DE POLLO. El ácido salicílico es un inhibidor conocido de varias deshidrogenasas (7, 11); investigaciones llevadas a cabo con anterioridad en nuestro Departamento indicaron que tanto el ácido salicílico como el acetilsalicílico inhiben competitivamente al sistema xantina-xantindeshidrogenasa-azul

de metileno (14). Otros autores han señalado que la acción inhibidora del ácido salicílico sobre varias deshidrogenasas se ejerce por competencia con los cofactores NAD, NADP o con sus formas reducidas (7).

Nosotros hemos estudiado las acciones inhibitoras manifestadas por los ácidos salicílico y acetilsalicílico, empleando como aceptores tanto el NAD como DCI.

En primer lugar se procedió a investigar la reversibilidad de las inhibiciones. Se mantuvo una disolución enzimática tamponada a pH 7,4 en contacto con ácido salicílico o acetilsalicílico ($7,1 \times 10^{-3}$ M), durante 60 minutos a 25° C. A continuación, una parte alícuota de las mezclas se sometió a diálisis frente a tampón durante 48 horas. En todos los casos, las actividades enzimáticas se compararon con las de correspondientes muestras de enzima exentas de inhibidor, pero sometidas a manipulaciones paralelas que las que lo contenían. Las actividades enzimáticas se determinaron empleando DCI ($4,2 \times 10^{-5}$ M) como aceptor. La observación de los resultados (tabla III) permite concluir que los ácidos salicílico y acetilsalicílico se comportan como inhibidores reversibles de la xantindeshidrogenasa.

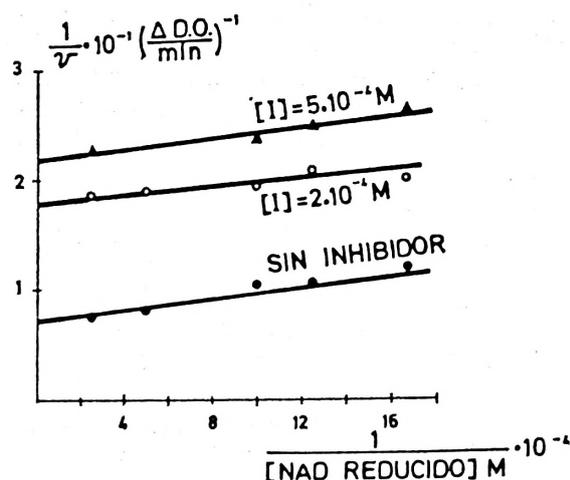


Fig. 7. Inhibición por la adenina del sistema NAD reducido-xantindeshidrogenasa-DCI.

Tabla III. Reversibilidad de la Inhibición de la xantindeshidrogenasa por ácido salicílico (A.S.) y ácido acetilsalicílico (A.A.S.).

En los ensayos efectuados antes de la diálisis, la concentración final de ácido salicílico y ácido acetilsalicílico era de $2,1 \times 10^{-3}$ M.

Adiciones al Enzima	Actividad* con Xantina	
	6×10^{-5} M	1×10^{-4} M
—	5,96	6,36
A.S.	3,76	3,13
Diálisis 48 h.		
—	4,30	4,80
A.S.	4,26	4,90
—		
—	7,20	8,15
A.A.S.	4,57	5,05
Diálisis 48 h.		
—	6,15	6,65
A.A.S.	5,80	6,55

* Δ D.O. $\times 10^2$ /min.

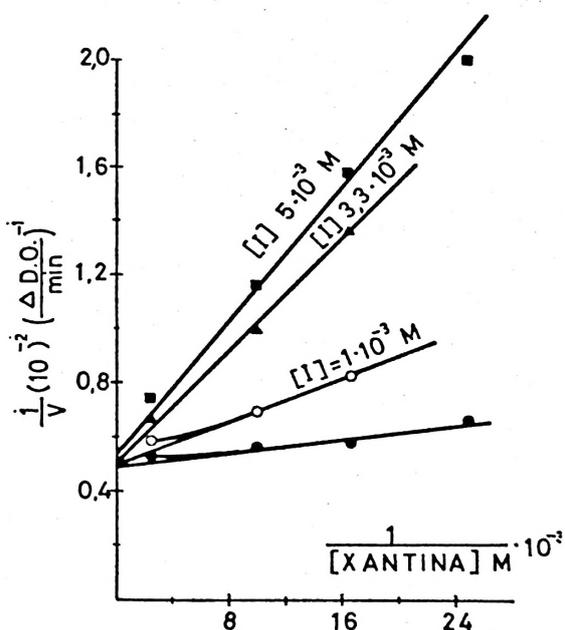


Fig. 8. Inhibición por el ácido salicílico del sistema xantina xantindeshidrogenasa NAD ($1,2 \times 10^{-3}$ M).

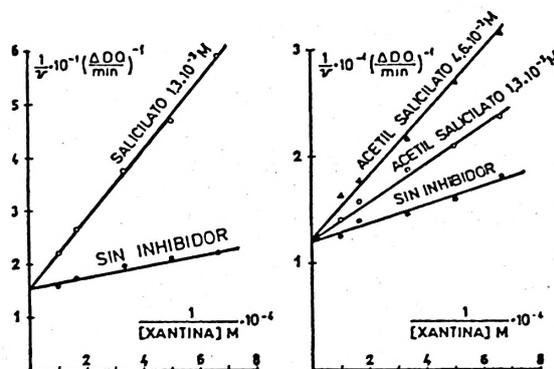


Fig. 9. Inhibición por los ácidos salicílico y acetil salicílico del sistema xantina-xantindeshidrogenasa-DCI.

La inhibición inducida por el salicílico sobre el sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD ($1,2 \times 10^{-3}$ M) es de tipo competitivo ($K_i = 1,4 \times 10^{-3}$ M). La representación de Lineweaver-Burk se consigna en la figura 8.

Los ácidos salicílico y acetilsalicílico se manifiestan como inhibidores competitivos en el sistema xantina-xantindeshidrogenasa-DCI ($4,2 \times 10^{-5}$ M) (fig. 9). Las constantes de inhibición halladas son K_i (salicílico) = $3,1 \times 10^{-4}$ M y K_i (acetilsalicílico) = $1,6 \times 10^{-3}$, respectivamente.

En cambio, operando con NAD reducido y DCI ($4,2 \times 10^{-5}$ M) las inhibiciones obtenidas son de naturaleza acompetitiva, con K_i (salicílico) = $2,6 \times 10^{-3}$ M y K_i (acetilsalicílico) = $7,2 \times 10^{-3}$ M (fig. 10).

Las observaciones descritas sugieren, en conjunto, que el salicílico y el acetilsalicílico compiten por el mismo locus enzimático al que se enlazan las purinas para deshidrogenarse, el cual es distinto del responsable de la actividad deshidrogenásica del NAD reducido. Este comportamiento de la xantindeshidrogenasa hepática difiere, por tanto, del manifestado por la mayoría de las deshidrogenasas que hasta ahora se han estudiado (7, 11).

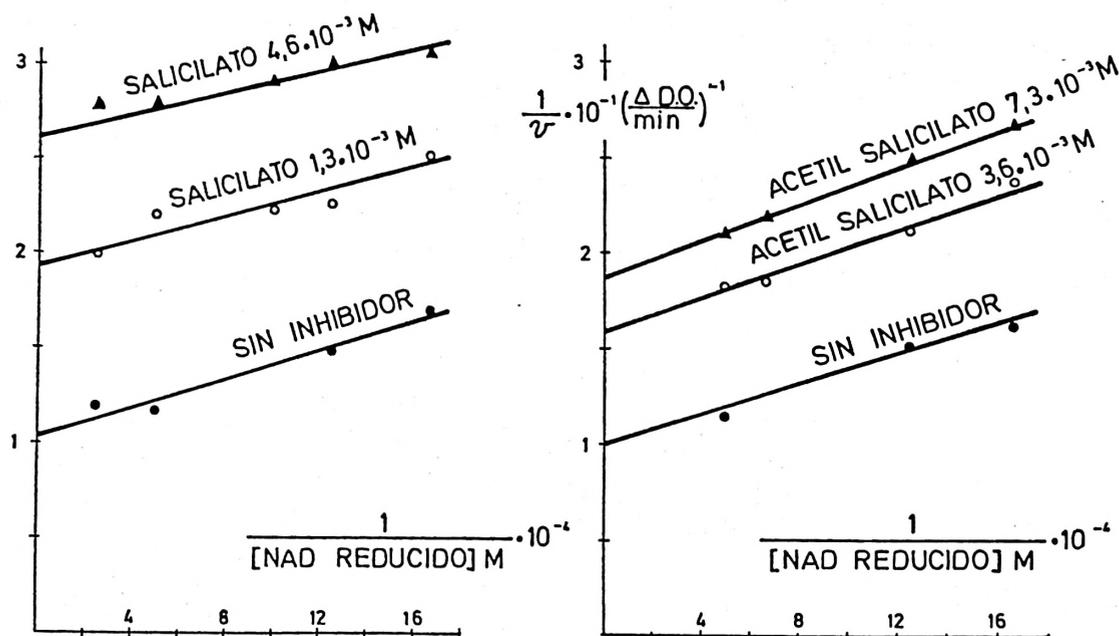


Fig. 10. Inhibición por los ácidos salicílico y acetil salicílico del sistema NAD reducido-xantindeshidrogenasa-DCI.

Discusión

Las observaciones experimentales que acabamos de describir ponen de manifiesto que la actividad catalítica de la xantindeshidrogenasa hepática resulta notablemente modificada por la presencia de las propias bases púricas, reconocidas como precursoras del ácido úrico (12, 16, 19); los ensayos realizados muestran, también, que la acción de las purinas viene afectada por la concentración del aceptor fisiológico NAD presente.

La adenina — como la urea — provoca una inhibición competitiva con respecto a la xantina si la concentración constante de NAD es $1,2 \times 10^{-3}$ M, pero si el NAD se halla presente en concentración menor (4×10^{-5} M), la inhibición resulta no competitiva; esta diferencia es debida, probablemente, a la combinación de los inhibidores con las formas oxidada y reducida del enzima, lo que también explica que, al manejar al NAD como sustrato de con-

centración variable, manteniendo constante la de xantina, se observen inhibiciones de tipo no competitivo y no del acompetitivo, como cabría esperar de la existencia de una etapa irreversible entre los instantes de unión de las moléculas de xantina y de NAD al enzima (4, 5, 9). Con NAD reducido como donador y DCI como aceptor electrónico, las inhibiciones producidas son de tipo acompetitivo, de acuerdo con el hecho admitido de que la actividad frente al NAD reducido de la xantindeshidrogenasa se localiza en un centro activo distinto del responsable de su actividad sobre la xantina (13).

La concurrencia de las distintas purinas libres — tanto las que actúan como sustratos, como las exclusivamente inhibidoras de la xantindeshidrogenasa — en las localizaciones celulares de libre acceso para el enzima, significa que puedan influir sobre su actividad y, por tanto, sobre la uricogénesis. Si se halla presente adenina cuando además existe inhibición por

el sustrato — xantina o hipoxantina — se observa una disminución de las velocidades de reacción, así como un desplazamiento de las velocidades máximas reales que puede alcanzar, hacia las concentraciones más elevadas de sustrato. Por otra parte, la inhibición no competitiva provocada por la adenina con respecto al NAD sugiere que la magnitud de la inhibición, como la de los propios sustratos, podría modificarse según la concentración del aceptor fisiológico — nótese que se ha hallado que K_i (intersección) $>$ K_i (pendiente) —, con lo que la acción modificadora del NAD se comprende pueda ser muy significativa.

Se ha podido observar que la inhibición de la xantindeshidrogenasa por los ácidos salicílico y acetilsalicílico se ejerce por competencia con la xantina, tanto empleando NAD como DCI; las inhibiciones son incompetitivas, en cambio, operando con el sistema NAD reducido-xantindeshidrogenasa-DCI. Los hechos experimentales indican existe una diferencia de comportamiento entre la xantindeshidrogenasa y otras deshidrogenasas (7, 11), en las que el ácido salicílico compite con el NAD, NADP o con sus respectivas formas reducidas.

El conjunto de fenómenos observados permite sugerir que en la regulación de la uricogénesis fisiológica desempeñan relevantes papeles tanto las inhibiciones de la xantindeshidrogenasa provocadas por los propios sustratos — xantina e hipoxantina — y por otras purinas, como las concentraciones presentes de NAD, aceptor electrónico que a su vez condiciona la magnitud de las inhibiciones.

Resumen

La adenina y la purina se manifiestan como inhibidores reversibles de la xantindeshidrogenasa hepática de pollo. La purina inhibe competitivamente al sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD. La adenina también inhibe dicho sistema de modo competitivo; pero si la con-

centración de NAD es 4×10^{-5} M, la inhibición resulta no competitiva. Al operar con concentraciones variables de NAD y constante de xantina, la adenina se muestra inhibidor no competitivo de la xantindeshidrogenasa. Si el enzima se halla inhibido, además, por los sustratos xantina o hipoxantina, la purina y la adenina satisfacen la cinética de un inhibidor competitivo que actúa sobre un sistema ya inhibido por el propio sustrato. La urea inhibe a la xantindeshidrogenasa menos eficazmente, si bien por mecanismos aparentemente análogos a los de la adenina. La adenina inhibe competitivamente al sistema xantina-xantindeshidrogenasa-DCI, y de modo incompetitivo si el donador electrónico empleado es el NAD reducido.

El conjunto de los experimentos relatados sugiere que las purinas compiten por un mismo centro activo de la forma oxidada de la xantindeshidrogenasa. La adenina parece combinarse también, parcialmente, con la forma reducida libre presente durante la oxidorreducción catalítica.

El salicilato inhibe competitivamente al sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD o DCI y incompetivamente al sistema NAD reducido-xantindeshidrogenasa-DCI. Este comportamiento de la xantindeshidrogenasa en presencia de salicilato es, por tanto, distinto del exhibido por la mayoría de las deshidrogenasas estudiadas.

Bibliografía

1. CARRASCO, E.: Tesis doctoral. Barcelona, 1967.
2. CARRASCO, E., MARTÍN, E. J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **24**, 193, 1968.
3. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104, 1963.
4. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 173, 1963.
5. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 188, 1963.
6. DALZIEL, K.: *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1706, 1957.
7. DAWKINS, B. D., GOULD, B. J., STURMAN, J. A. y SMITH, M. J. H.: *J. Pharm. and Pharmacol.*, **19**, 355, 1967.
8. DOMINGO, E., BOZAL, J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **23**, 145, 1967.
9. DOMINGO, E., BOZAL, J. y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **25**, 275, 1969.

10. FELIG, J. y WILEY, C.: *Nature*, **181**, 51, 1958.
11. HINES, W. J. W. y SMITH, M. J. H.: *Nature*, **201**, 192, 1964.
12. JAMISON, C. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 106, 1963.
13. RAJAGOPALAN, K. V. y HANDLER, P.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 4097, 1967.
14. RAMIA, J., BOZAL, J., y CALVET, F.: *R. esp. Fisiol.*, **22**, 85, 1966.
15. RENY, C., RICHERT, D. A., DOISY, R. C., WELLS, I. C. y WESTERFELD, W. W.: *J. Biol. Chem.*, **217**, 293, 1955.
16. SEEGMILLER, J. E.: *Proc. Roy. Soc. Med.*, **59**, 292, 1966.
17. STRITTMATTER, C. F.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 2557, 1965.
18. WEBB, J. L.: In «Enzymes and Metabolic Inhibitors». Vol. I. Academic Press. Nueva York, pág. 134, 1963.
19. WYNGAARDEN, J. B., y SEEGMILLER, J. E.: *Metabolism*, **8**, 455, 1959.