

Influencia de la colchicina y del alopurinol sobre la uricogenesis. I. Cinética de sus acciones inhibitoras de la xantindeshidrogenasa hepática

C. Escarmís, J. Bozal y F. Calvet

Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Barcelona.

(Recibido el 23 de septiembre de 1969)

C. ESCARMIS, J. BOZAL and F. CALVET, *Influences of Colchicine and Allopurinol upon Uricogenesis. I. Kinetics of their Inhibitory Actions on Liver Xanthinedehydrogenase*. R. esp. Fisiol., 26, 109-120, 1970.

The inhibition induced by colchicine on chicken liver xanthinedehydrogenase is of a reversible type, whereas allopurinol inhibits the enzyme pseudoirreversibly.

Xanthine and allopurinol compete for the same active site of the enzyme, so that the substrate xanthine protects the dehydrogenase from the inhibitor, apparent $K_i = 8 \times 10^{-6}$ M. The interaction between allopurinol and the enzyme appears to satisfy a pseudofirst order kinetics. The second order constant found is $1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. The relation between the inactivation rates and the concentration of inhibitor appears to be non rectilinear. The mechanism of the inhibitory action exerted by allopurinol upon chicken xanthinedehydrogenase, $K_m = 4 \times 10^{-6}$ M, could be explained by the following sequence of reactions: $E + I \rightleftharpoons EI \rightleftharpoons (EI)$.

Se considera en la actualidad que la hiperuricemia reconoce como orígenes un catabolismo exacerbado de los ácidos nucleicos, una producción excesiva de ácido úrico por biosíntesis *de novo* a partir de sus precursores purínicos, o una anormal retención de uratos en la sangre, consecuencia de una excreción renal deficiente (24).

Las xantindeshidrogenasas, que son las enzimas responsables de la transformación de la hipoxantina en xantina y de ésta en ácido úrico — etapas finales de la secuencia reaccional uricogénica —, ocupan una situación privilegiada para regular el ritmo de la producción úrica (26).

La acción de algunos fármacos utilizados para el tratamiento de la hiperurice-

mia gotosa, se interpreta precisamente como resultado de las interferencias de la actividad xantindeshidrogenásica que provocan. Según HARTUNG (13), la colchicina que no actúa como agente uricosúrico — posiblemente disminuye la velocidad de biosíntesis del ácido. La incidencia de este alcaloide, observada *in vitro*, sobre algunas xantindeshidrogenasas, como las de hígado de cobaya y de rata, ya fue mencionada por algunos autores (1, 13). Investigaciones recientes realizadas en nuestro Departamento permitieron comprobar que la colchicina actúa como inhibidor de la deshidrogenación de la xantina a ácido úrico, catalizada por la xantindeshidrogenasa hepática de pollo, de rata, de ratón, de cerdo y humana (5, 16, 17, 20).

El alopurinol, 4-hidroxipirazolo-(3,4-d)-pirimidina, es otro fármaco antigotoso recientemente descrito por diversos autores como inhibidor de la xantinoxidasa de leche (7, 8, 10, 22) y también de la xantindeshidrogenasa de hígado y de riñón de rata (3), de la hepática de ratones (7) y de la humana (7, 23), así como de la de mucosa intestinal del hombre (27).

En el presente trabajo se describen los resultados obtenidos en los estudios mecanísticos y cinéticos de las acciones inhibitoras ejercidas sobre la xantindeshidrogenasa hepática de pollo, por parte de cada uno de dichos fármacos, la colchicina y el alopurinol.

Material y métodos

SUSTRATOS, ACEPTORES ELECTRÓNICOS E INHIBIDORES. Las disoluciones de xantina (Merck) y de alopurinol (Calbiochem) se prepararon añadiendo unas gotas de sosa diluida 0,1 N a cada uno de los sólidos, con posterior incorporación de tampón de fosfatos 0,05 M de pH 7,4, y ajustando adecuadamente el pH final.

Las disoluciones de azul de metileno (Merck), de NAD (Boehringer) y de colchicina (Merck) se efectuaron directamente en tampón de fosfatos 0,05 M de pH 7,4.

PREPARADOS ENZIMÁTICOS. Los homogenados hepáticos de pollo se prepararon mediante un desintegrador Turmix por trituration de las glándulas recién extraídas en tampón fosfatos 0,05 M de pH 7,4, operando en cámara refrigerada a 5° C.

El preparado de xantindeshidrogenasa de hígado de pollo parcialmente purificado se obtuvo siguiendo una adaptación de las técnicas originales de WESTERFELD (21), desarrollada en nuestro Departamento por CARRASCO *et al.* (5). La actividad específica del preparado enzimático obtenido fue de 11,5 U.I., esto es, 11,5 μ moles de ácido úrico producido por minuto y por gramo de preparado.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES XANTINDESHIDROGENÁSICAS. Para la determinación de la actividad xantindeshidrogenásica de los homogenados, se incubaron muestras de éstos con los volúmenes adecuados de una disolución del sustrato (xantina entre 1×10^{-4} M y 5×10^{-4} M), 0,5 ml de otra del transportador electrónico (azul de metileno, M.B., 0,01 M) y de la cantidad necesaria de tampón fosfatos 0,05 M de pH 7,4 para completar el volumen global hasta 16 ml. Las incubaciones se realizaron a $30 \pm 0,1^\circ$ C durante períodos de tiempo determinados y se interrumpieron por adición de 4 ml de disolución de ácido perclórico al 5 %. En los filtrados obtenidos al cabo de 15 minutos de reposo, se determinó colorimétricamente el ácido úrico, mediante el reactivo de BROWN (4).

La determinación de la actividad enzimática del preparado parcialmente purificado de xantindeshidrogenasa se practicó incubando una mezcla compuesta por una disolución del preparado enzimático en tampón de fosfatos 0,05 M de pH 7,4, xantina (5×10^{-5} a 10^{-3} M) y NAD (6×10^{-5} a $1,5 \times 10^{-3}$ M) — como aceptor electrónico — hasta completar un volumen de 3 ml, leyendo espectrofotométricamente a $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ los incrementos de D.O. producidos por el NAD que resulta reducido. Las cantidades de NAD reducido y las de ácido úrico formadas son equimolares.

PARTE EXPERIMENTAL

REVERSIBILIDAD DE LA INHIBICIÓN DE LA XANTINDESHIDROGENASA POR LA COLCHICINA. Este estudio se realizó como complemento de previas investigaciones cinéticas sobre la acción inhibitora de la colchicina, llevadas a cabo en nuestro Departamento (5, 16, 17, 20).

El homogenado hepático — o el preparado enzimático parcialmente purificado — se mantuvo en contacto con la colchicina durante tres horas a 5° C, y a

Tabla 1. *Reversibilidad de la inhibición por la colchicina de la xantindeshidrogenasa de homogenados hepáticos crudos.*

Concentraciones: Incubado = 4 mg hígado/ml; xantina = 6×10^{-5} M; M. B. = $3,1 \times 10^{-4}$ M; colchicina = 6×10^{-3} M. Tiempo de incubación, 20 minutos.

Homogenado	Sin diálisis previa Δ D.O.	Después de la diálisis Δ D.O.
Sin colchicina	0,186	0,111
Con colchicina	0,082	0,110

continuación se sometió a una diálisis prolongada (48-60 h); paralelamente, se dializaron muestras del homogenado, o del preparado purificado. La diálisis se practicó en cámara refrigerada a 5°C , utilizando sacos de celofana Visking Sausage NO JAX 32, sumergidos en volúmenes renovados de tampón de fosfatos 0,05 M de pH 7,4.

En la tabla I se muestran los valores colorimétricos correspondientes al úrico producido en las correspondientes incubaciones, obtenidos operando con un homogenado crudo de hígado de pollo (4 mg/ml).

En los ensayos realizados con el preparado enzimático purificado se obtuvieron resultados análogos, comprobando así que la acción inhibidora ejercida por la colchicina *in vitro* sobre la xantindeshidrogenasa hepática de pollo es cuantitativamente reversible.

ACCIÓN INHIBIDORA DEL ALOPURINOL SOBRE LA XANTINDESHIDROGENASA HEPÁTICA DE POLLO. (*Inhibición progresiva*). Se inició la reacción vertiendo 0,5 ml de una disolución del preparado enzimático (3 mg por ml) en las cubetas espectrofotométricas, que contenían 2,5 ml de una mezcla tamponada de xantina y NAD, o de xantina, NAD y alopurinol.

Las curvas de velocidad (fig. 1) muestran que la velocidad de reacción disminuye rápidamente con el tiempo, es decir, que la inhibición es progresiva.

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CONTACTO PREVIO ENTRE EL ENZIMA Y EL INHIBIDOR. La rápida disminución progresiva observada de la velocidad de la reacción catalizada por la xantindeshidrogenasa en presencia de alopurinol, nos indujo a comprobar la influencia del tiempo de contacto previo entre el enzima y el alopurinol sobre la inactivación de la deshidrogenasa. Para ello se mantuvieron en contacto el preparado de xantindeshidrogenasa y el alopurinol de distintas concentraciones, durante intervalos de tiempo crecientes, transcurridos los cuales se vertieron porciones alicuotas de estas disoluciones sobre sendas mezclas tamponadas de xantina y NAD, con objeto de analizar las actividades enzimáticas correspondientes.

En la figura 2 se representan los porcentajes de inhibición obtenidos mediante

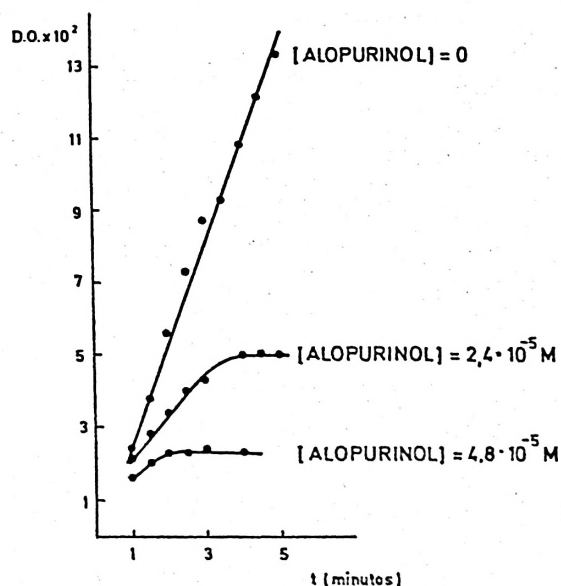


Fig. 1. *Acción del alopurinol sobre el sistema xantina-X.D.H.-NAD.*
Concentraciones: Xantina = 1×10^{-4} M; NAD = $1,2 \times 10^{-3}$ M.

las incubaciones analíticas en función del tiempo de precontacto y de la concentración de alopurinol. Se observa cómo la inactivación depende del tiempo de contacto previo entre el enzima y el inhibidor y cómo una concentración de éste de $4,5 \times 10^{-7}$ M (fig. 2) — [alopurinol] en precontacto $1,68 \times 10^{-6}$ M — provoca en muy poco tiempo una inactivación total. El intervalo de tiempo óptimo para alcanzar la inactivación máxima, con cada una de las concentraciones ensayadas de alopurinol resulta ser de unos 30 minutos.

La influencia observada del tiempo de precontacto sobre la inhibición efectiva ejercida por el alopurinol, sugiere que debe formarse un complejo con el enzima, del cual el inhibidor no resulta posteriormente desplazado ni por la xantina ni por el NAD, por lo menos, en el período de incubación necesario para determinar la actividad enzimática (5 minutos) durante el cual no se aprecia recuperación alguna de actividad.

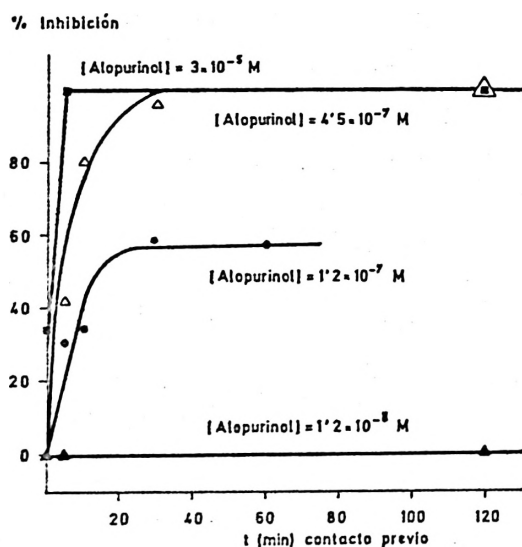


Fig. 2. Inhibición de la xantina deshidrogenasa a diferentes tiempos de contacto previo con alopurinol.

Concentraciones: Xantina = 1×10^{-4} M; NAD = $1,2 \times 10^{-3}$ M.

NATURALEZA DE LA INHIBICIÓN. El gran poder inactivador exhibido por el alopurinol, así como el hecho de que ni la xantina ni el NAD puedan desplazarlo de su unión con el enzima, nos sugirió la posibilidad de que la unión enzima-alopurinol fuera irreversible. Con objeto de comprobar si el complejo formado era o no susceptible de experimentar disociación, se sometieron a diálisis o a dilución adecuadas mezclas del enzima y del inhibidor.

a) *Diálisis de mezclas de xantina deshidrogenasa y alopurinol.* Se mantuvieron en contacto previo el enzima y el alopurinol a 30°C , por lo menos, durante 30 minutos, dializando posteriormente la mezcla frente al tampón habitual. En la tabla II se muestran los resultados de medición de la actividad xantina deshidrogenásica obtenidos con una mezcla después de dializada durante 72 horas. Se aprecia claramente que en la muestra dializada sólo tiene lugar una recuperación parcial de la actividad enzimática. Por lo tanto, la inhibición inducida por este fármaco puede considerarse como pseudoirreversible.

b) *Dilución de mezclas de xantina deshidrogenasa y alopurinol.* La actividad perdida por la xantina deshidrogenasa mantenida en contacto con alopurinol durante 30 minutos no se recupera por dilución de la mezcla diez veces con tampón. Tampoco se ha podido observar la menor recuperación de actividad xantina deshidrogenásica cuando se ha experimentado con períodos de precontacto muy cortos, de $\frac{1}{2}$, 1 y 2 minutos. Estos resultados, junto con la parcial recuperación de actividad que se manifiesta en el experimento de diálisis antes descrito, sugieren que el alopurinol se comporta como un inhibidor pseudo irreversible de la xantina deshidrogenasa.

Respecto a la validez de estos ensayos de dilución como comprobantes de la

Tabla II. Efecto de la diálisis sobre la inhibición de la xantindeshidrogenasa por el alopurinol

Velocidad inicial: $\Delta DO \times 10^3/\text{min.}$ Concentraciones: Xantina = 1×10^{-4} M; NAD = $1,2 \times 10^{-3}$ M; Alopurinol = 1×10^{-6} M. Xantindeshidrogenasa = 11,5 U.I.

	Tiempo de contacto previo enzima + alopurinol		Diálisis posterior
	30 min. a 30°C	72 h a 50°C	72 h a 50°C
Sin Alopurinol	3,2	2,4	1,6
Con Alopurinol	0,2	0,2	0,9

reversibilidad o irreversibilidad de un inhibidor, se procedió a aplicar la misma técnica operatoria al estudio de otro inhibidor xantindeshidrogenásico, la adenina, la cual se manifestó como típicamente reversible (tabla III).

INHIBICIÓN POR EL ALOPURINOL DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE XANTINDESHIDROGENASA. Para la caracterización definitiva de la naturaleza de la inhibición inducida por el alopurinol se han estudiado los efectos del fármaco sobre cantidades crecientes del enzima. En la figura 3 se muestran, respectivamente, los resultados obtenidos de las experiencias llevadas a cabo con y sin contacto previo de la xantindeshidrogenasa con el fármaco.

Cuando se mantuvo un contacto previo de 30 minutos entre el enzima y el inhibidor se obtuvieron líneas paralelas, lo que significa se trata de un inhibidor irreversible o seudoirreversible. Las concentraciones de los reactivos presentes fueron $1,6 \times 10^{-7}$ M y $3,2 \times 10^{-7}$ M de alopurinol, $0,64 \times 10^{-4}$ M de xantina y $1,2 \times 10^{-3}$ M de NAD. En los ensayos practicados sin contacto previo, las concentraciones de alopurinol fueron 2×10^{-5} M y 4×10^{-5} M, siendo las de xantina y NAD las mismas que en el experimento anterior. Debe tenerse en cuenta que, en este caso, las curvas de velocidad obtenidas son del mismo tipo de las que apa-

recen en la figura 1. También se aprecia la existencia de una cantidad de enzima inactivado, lo cual sugiere que la velocidad de inactivación enzimática es comparable a la de actuación de la xantindeshidrogenasa en estas condiciones de experimentación.

Como se puede deducir de la figura 3, la concentración de alopurinol necesaria para inactivar el enzima es mayor si se vierte éste en una mezcla tamponada de alopurinol, xantina y NAD, que si se mantiene en contacto previo el enzima y el inhibidor, sugiriendo que la xantina ejerce una acción protectora sobre la xantindeshidrogenasa, ya que el NAD no actúa en tal sentido, según se describe más adelante.

Tabla III. Reversibilidad de la inhibición de la xantindeshidrogenasa por la adenina. Velocidades iniciales: $\Delta DO \times 10^3/\text{min.}$

Contacto previo XDH + Adenina (min.)	Sin dilución Adenina 1×10^{-3} M	Dilución 1:10 Adenina 1×10^{-4} M
0	1,1	1,9
1	1,3	2,2
1	1,2	2,1
2	1,2	2,3
XDH (Sin Adenina)	3,2	2,9

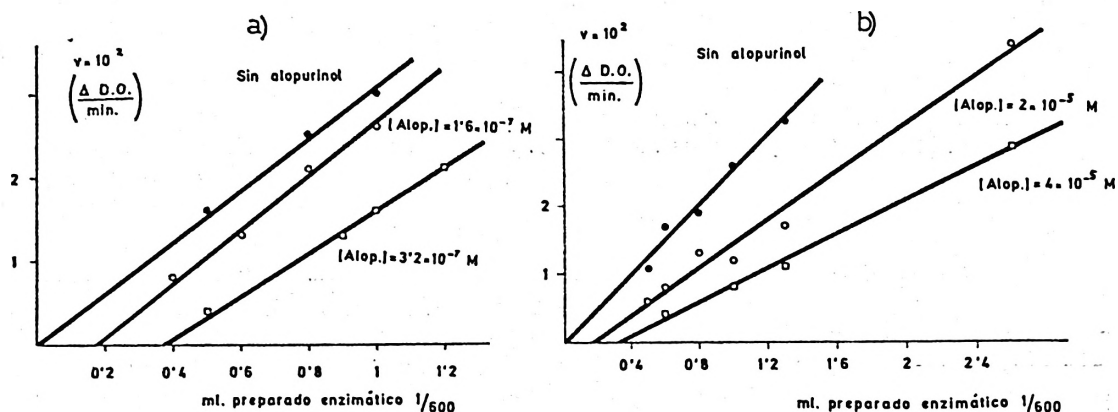


Fig. 3. Inhibición por alopurinol de concentraciones crecientes de xantindeshidrogenasa. a) Contacto previo 30 minutos; b) Sin contacto previo.

PROTECCIÓN DEL ENZIMA POR SU SUSTRATO XANTINA. El estudio de la acción protectora del sustrato se llevó a cabo realizando experiencias con distintas concentraciones de xantina y de NAD en las que no se practicó el contacto previo del alo-

purinol y el enzima, y ensayando distintas concentraciones de xantina y NAD.

Los resultados muestran que existe una correlación inversa entre la concentración de xantina empleada y la inactivación enzimática producida por unas mismas can-

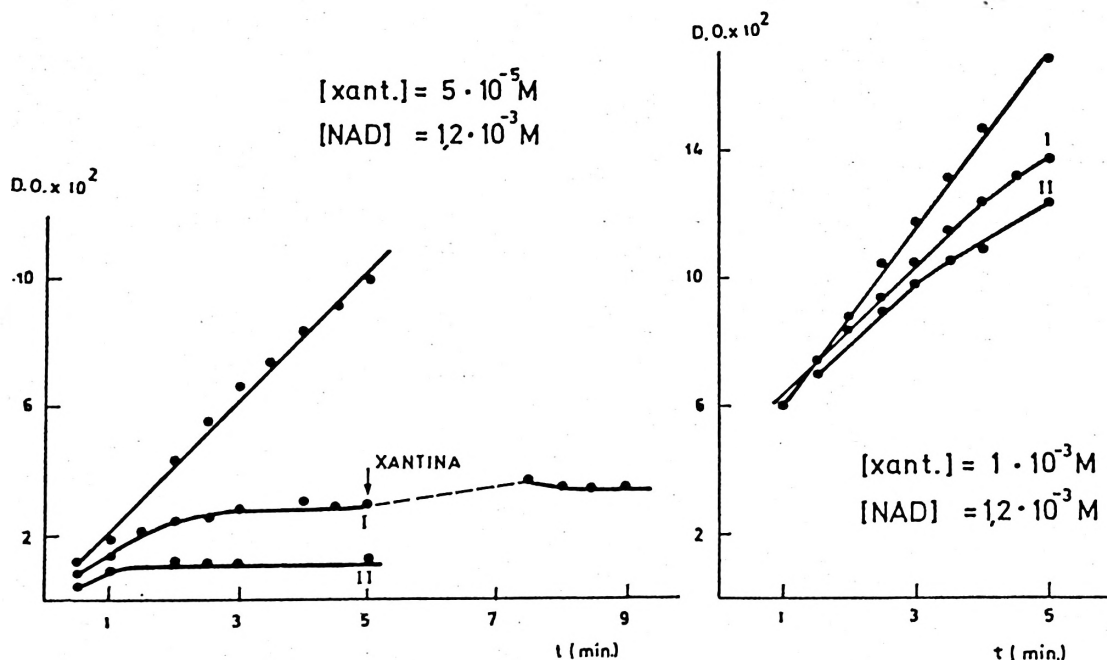


Fig. 4. Competencia de la xantina y el alopurinol en la inhibición de la xantindeshidrogenasa por alopurinol.

Concentraciones: Alopurinol: I = 2.4×10^{-5} M; II = 4.16×10^{-5} M.

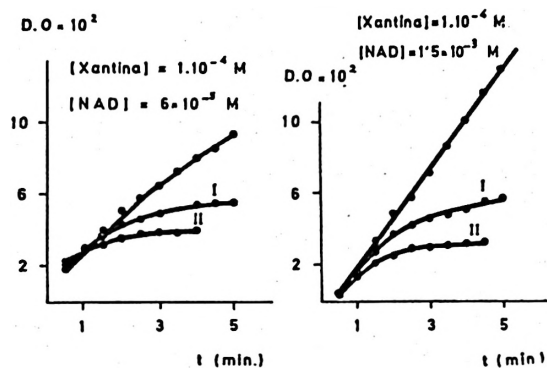


Fig. 5. Alopurinol y NAD no compiten en la inhibición de la xantindeshidrogenasa.

tidades de alopurinol (fig. 4). Parece fuera de duda, por tanto, que la xantina ejerce una definida acción protectora sobre la deshidrogenasa. Sin embargo, si la xantina — hasta una concentración de $4,2 \times 10^{-4} M$ — se adiciona al enzima previamente inactivado por el alopurinol, no se observa incremento sensible de actividad deshidrogenásica, es decir, el sustrato no logra desplazar el inhibidor (figura 4).

El NAD no ejerce, por su parte, influencia alguna sobre la inactivación de la xantindeshidrogenasa por el fármaco (fig. 5).

La acción protectora ejercida por la xantina — y no por el NAD — sugiere que debe existir una competencia entre aquella y el alopurinol por un mismo centro activo del enzima.

La existencia de esta competencia se ha comprobado realizando representaciones de LINEWEAVER y BURK, para el sistema xantina-xantindeshidrogenasa-NAD en presencia y ausencia de alopurinol. Las representaciones se obtuvieron tomando como velocidades iniciales las tangentes a las curvas de velocidad obtenidas leyendo cada 15 segundos, durante 2 minutos, después de haber añadido el preparado enzimático sobre mezclas tamponadas, de xantina, NAD, y en los ensayos de inhibición, alopurinol. La representación de

cada caso debe considerarse, sin embargo, sólo como aproximada, debido a la rápida inactivación producida por el alopurinol (fig. 6). En el intervalo de concentraciones de xantina utilizadas empieza ya a manifestarse el conocido fenómeno de inhibición de la xantindeshidrogenasa por su propio sustrato xantina, pues se observa una ligera disminución de la velocidad de reacción para concentraciones elevadas de la purina. La presencia de alopurinol ocasiona un claro desplazamiento del máximo de velocidades hacia las concentraciones superiores de xantina, lo que constituye una comprobación de que tiene lugar una competencia entre el alopurinol y la xantina, por un mismo centro activo del enzima. El valor obtenido para la K_i aparente (promedio) es: $K_i = 0,8 \times 10^{-5} M$.

CINÉTICA DE LA REACCIÓN ENTRE LA XANTINDESHIDROGENASA Y EL ALOPURINOL. Para estudiar la cinética de la reacción entre el alopurinol y la xantindeshidrogenasa se operó con diversas disoluciones tamponadas de alopurinol de concentraciones crecientes, las cuales se mezclaron

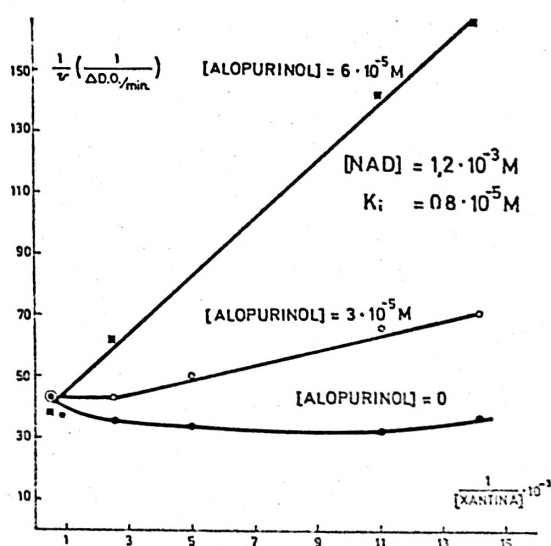


Fig. 6. Acción inhibitoria del alopurinol sobre el sistema xantina-X.D.H.-NAD.

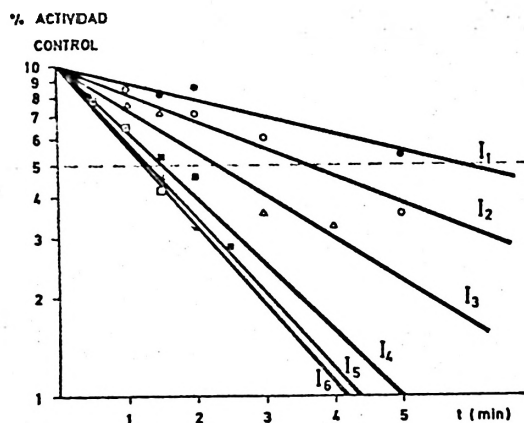


Fig. 7. Velocidad de inactivación de la xantindeshidrogenasa por el alopurinol. Concentraciones: Alopurinol: $I_1 = 6 \times 10^{-7}$ M; $I_2 = 1 \times 10^{-6}$ M; $I_3 = 1,6 \times 10^{-6}$ M; $I_4 = 3 \times 10^{-6}$ M; $I_5 = 4 \times 10^{-6}$ M; $I_6 = 5 \times 10^{-6}$ M.

con otra de nuestro preparado enzimático (1/300) en tampón, manteniendo el contacto, enzima-inhibidor a 30°C , durante diferentes intervalos de tiempo, transcurridos los cuales se les incorporó, en las cubetas espectrofotométricas, una mezcla tamponada de xantina y NAD, con lo que se iniciaban así las reacciones enzimáticas.

Las concentraciones presentes de sustrato y de NAD fueron, respectivamente, 1×10^{-4} M y $1,2 \times 10^{-3}$ M. En todos los ensayos se cuidó de que, durante la incubación que implica la técnica analítica de determinación de actividades enzimáticas, el alopurinol se hallara a concentraciones lo suficientemente bajas para que, gracias a la presencia protectora de la xantina, no pudiera ejercer ulterior acción inhibidora alguna.

Con las velocidades iniciales obtenidas se calcularon las actividades enzimáticas remanentes expresadas en porcentajes de la actividad de los ensayos testigo — sin alopurinol — correspondientes a los distintos tiempos de precontacto con el inhibidor, y se representaron en una gráfica semilogarítmica frente a tiempo de con-

tacto previo entre el enzima y el alopurinol. Como se muestra en la figura 7, se obtuvieron líneas rectas, lo que sugiere que el enzima actuaba en presencia de un exceso de inhibidor y que la reacción se ajusta a la cinética de pseudoprimer orden.

El cálculo de la constante de velocidad de segundo orden se efectuó por el método de ALDRIDGE (2). La representación de los valores $t_{1/2}$ — calculados mediante las gráficas semilogarítmicas — en función de $1/[I]$ proporciona una recta (figura 8), lo cual sugiere que se trata de una reacción de segundo orden, en la cual la concentración de inhibidor es muy grande respecto a la de enzima. El valor promedio de la constante de velocidad de segundo orden encontrada fue $1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Las velocidades iniciales de inactivación del enzima, obtenidas en presencia de diversas concentraciones de alopurinol, se determinaron trazando las tangentes a las curvas en el origen, obtenidas al representar los porcentajes de actividad enzimática control en función del tiempo de precontacto (fig. 9) para una concentración de alopurinol 2×10^{-6} M. Representando dichas velocidades iniciales en fun-

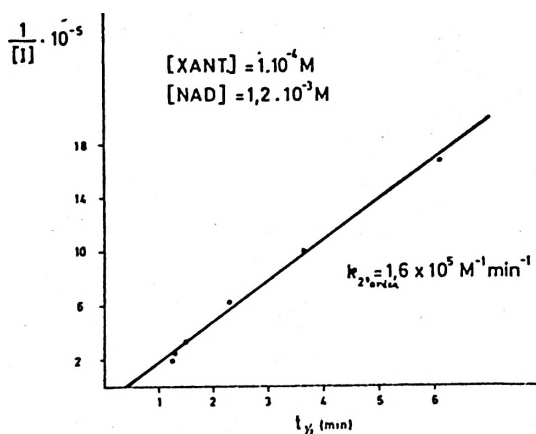


Fig. 8. Representación de los $t_{1/2}$ respecto a diferentes concentraciones de alopurinol.

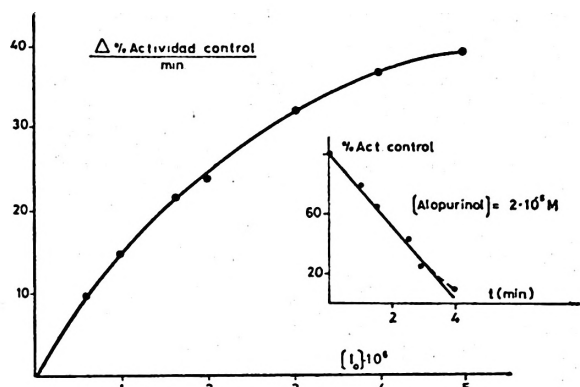


Fig. 9. Velocidades iniciales de inactivación de la xantindeshidrogenasa por concentraciones crecientes de alopurinol.

ción de las concentraciones de inhibidor se obtiene una rama de hipérbola (fig. 9) (en lugar de una recta, como sería de esperar si la cinética fuese rigurosamente de segundo orden). Este efecto saturante de la concentración de inhibidor sugiere que pueda existir una secuencia de reacciones del tipo: $E + I \rightleftharpoons EI \rightleftharpoons (EI)$.

La suposición se halla en concordancia con lo propuesto por diversos autores para la inactivación de la tripsina (11, 15), la α -quimotripsina (11) y la acetilcolinesterasa (11, 14).

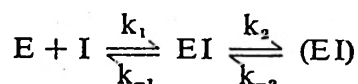
Un tratamiento de este proceso por el método del estado estacionario, teniendo en cuenta que $[I] \gg [E]$, conduce a una ecuación del mismo tipo que la de Michaelis para la reacción enzima-sustrato, que fue aplicada a nuestros datos en la forma:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \frac{1}{[I]_0}$$

En la figura 10 se puede observar un estricto cumplimiento de esta cinética. Valor de K_m aparente hallado (promedio) = 4×10^{-6} M.

Por otra parte, la parcial recuperación de la actividad enzimática por diálisis muy prolongada —indicada anteriormente—

sugiere la existencia de una pequeñísima velocidad de disociación del segundo complejo inactivo. Así, pues, un sistema de reacciones del tipo:



en el que $k_1 \gg k_{-1} + k_2$ y $k_{-2} \ll k_2$ explicaría el comportamiento del alopurinol como inhibidor seudoirreversible, así como la dependencia no lineal de la velocidad de inactivación del enzima respecto a la concentración de alopurinol, llegándose a un valor máximo cuando E se halle totalmente en forma del complejo intermedio EI, así como el pequeño valor obtenido para la K_m .

Este valor de $K_m = 4 \times 10^{-6}$ M, es el que realmente define el sistema de reacciones entre el enzima y el alopurinol, en lugar de la K_i aparente (8×10^{-6} M), que, como ya se indicó, era una determinación aproximada.

El valor de la constante de segundo orden calculada experimentalmente por nosotros sería una aproximación al valor del cociente $\frac{k_2}{K_m}$, ya que cuando $[I] \ll K_m$ la ecuación de Michaelis se reduce a:

$$v_0 = \frac{k_2}{K_m} [E]_0 [I]_0$$

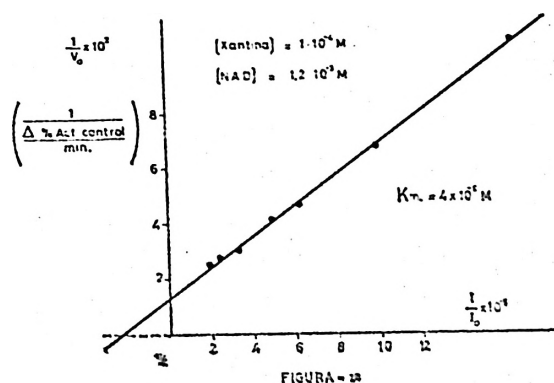


Fig. 10. Cálculo de la K_m de la reacción entre la xantindeshidrogenasa y el alopurinol.

la cual corresponde a una cinética de segundo orden.

Discusión

Mientras que la acción inhibidora de la colchicina sobre la xantindeshidrogenasa hepática de pollo *in vitro* es típicamente reversible, la ejercida por el alopurinol se manifiesta como seudoirreversible.

El sustrato xantina protege al enzima de la inactivación inducida por el alopurinol, no haciéndolo así el transportador electrónico NAD, indicando que el alopurinol y la xantina deben competir por un mismo centro activo de la xantindeshidrogenasa. Sin embargo, la xantina no desplaza al inhibidor una vez que éste ha inactivado total o parcialmente al enzima, contrariamente a lo que ocurre en otros casos conocidos, por ejemplo, en la inhibición de la acetoacético-descarboxilasa por la acetilacetona, en la que la inhibición se manifiesta de un modo progresivo debido a que la asociación del inhibidor con el enzima es lenta (12).

Siendo el alopurinol un isómero estructural de la hipoxantina, puede admitirse la formación de un complejo con la xantindeshidrogenasa por unión al mismo centro activo que la base púrica, si bien posteriormente es posible tenga lugar alguna transformación o reestructuración, más lenta, a un segundo complejo. (Es un hecho comprobado que la xantina y la hipoxantina se unen a un mismo centro activo del enzima [6].)

El valor de la K_m aparente que define el sistema de reacciones entre el alopurinol y la xantindeshidrogenasa hepática de pollo (4×10^{-6} M) es inferior a los correspondientes a la unión del enzima con sus propios sustratos (xantina $2,4 \times 10^{-5}$ M e hipoxantina $3,4 \times 10^{-5}$ M) (6), indicando que el alopurinol presenta más afinidad por el enzima que los propios sustratos fisiológicos del catalizador.

Los tres compuestos, la hipoxantina, la

xantina y el alopurinol, se unen, pues, al mismo centro activo del enzima, pero con la particularidad de que la hipoxantina y la xantina lo hacen aproximadamente con una misma afinidad, deshidrogenándose, respectivamente, a xantina y ácido úrico y liberando enzima reducido, el cual puede ser reoxidado por el NAD según un mecanismo ping-pong (6). El alopurinol, por el contrario, según prueban nuestros resultados, exhibe una mayor afinidad para el enzima y forma un segundo complejo inactivo. Lo cual sugiere el importante papel jugado por el anillo no pirimidínico —imidazol en las purinas y pirazol en el alopurinol— en la mayor afinidad que muestra el alopurinol por la xantindeshidrogenasa, y en la formación del segundo complejo inactivo.

El alopurinol no es sustrato del sistema xantindeshidrogenasa-NAD. Sin embargo, según ELION *et al.* (9), resulta transformado en aloxantina *in vivo* en ratones, perros y hombres. Asimismo, según SPECTOR *et al.* (25), puede actuar como sustrato de la xantinoxidasa de leche, usando como aceptor electrónico al metosulfato de fenacina; y es incapaz de reducir al FAD del enzima, por lo que se observa una velocidad muy pequeña de transferencia electrónica al O_2 . La incapacidad del alopurinol para reducir al FAD podría asimismo explicar que dicho fármaco no actúe como sustrato del sistema xantindeshidrogenasa-NAD, ya que parece que el NAD se une precisamente al grupo flavínico del enzima (19).

La interpretación que proponemos de nuestros resultados creemos que permite explicar también los obtenidos por ELION (7), quien, trabajando con xantinoxidasa de leche de ratón y humana, ha observado que el alopurinol se comporta de modo distinto si se experimenta con contacto previo enzima-inhibidor o sin él, y los descritos por ISA *et al.* (18) con el enzima de la leche —que difieren de los publicados por WATTS *et al.* (27) con xantinoxidasa de yeyuno humano.

Resumen

La inhibición provocada por la colchicina sobre la xantindeshidrogenasa hepática de pollo es reversible. El alopurinol, por el contrario, se comporta como un inhibidor seudoirreversible del enzima. El alopurinol y la xantina compiten por el mismo centro activo enzimático, por lo que la xantina protege a la deshidrogenasa de la acción del fármaco, K_i aparente $= 8 \times 10^{-6}$ M. La reacción entre el alopurinol y la xantindeshidrogenasa se ajusta a la cinética de pseudoprimer orden. Constante de segundo orden hallada: $1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. La dependencia de las velocidades de inactivación respecto de las concentraciones de inhibidor no es rectilínea. Una secuencia reaccional del tipo $E + I \rightleftharpoons EI \rightleftharpoons (EI)$ podría explicar el comportamiento del alopurinol como inhibidor de la xantindeshidrogenasa de pollo, $K_m = 4 \times 10^{-6}$ M.

Bibliografía

1. AFFONSO, O. R., E. MITIDIERI y G. G. VILLELA: *Nature*, **192**, 666, 1961.
2. ALDRIDGE, W. N.: *Biochem. J.*, **46**, 451, 1950.
3. ALEXANDER, J. A., G. P. WHEELER, D. D. HILL y H. P. MORRIS: *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 7, 881, 1966.
4. BROWN, H.: *J. Biol. Chem.*, **158**, 601, 1945.
5. CARRASCO, E., J. MARTÍN-ESTEVE y F. CALVET: *R. esp. Fisiol.*, **24**, 193, 1968.
6. DOMINGO, E.: Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, 1969.
7. ELION, G. B.: *Ann. Rheum. Dis.*, **25**, 608, 1966.
8. ELION, G. B., S. CALLAHAN, H. NATHAN, S. BIEBER, R. W. RUNDLES y G. H. HITCHINGS: *Biochem. Pharmacol.*, **12**, 85, 1963.
9. ELION, G. B., A. KOVENSKY, G. H. HITCHINGS, E. METZ y R. W. RUNDLES: *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 863, 1966.
10. ELION, G. B., T. J. TAYLOR y G. H. HITCHINGS: *VI Int. Cong. Biochem.*, Abstract IV, 42, 1964.
11. FAHRNEY, D. E., y A. M. GOLD: *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 997, 1963.
12. FRIDOVICH, I.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 1043, 1968.
13. HARTUNG, E. F.: *Art. Rheum.*, **4**, 18, 1961.
14. KITZ, R., y WILSON, I. B.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 3245, 1962.
15. MARES-GUÍA, M., y E. SHAW: *J. Biol. Chem.*, **242**, 5782, 1967.
16. MARÍN, A., J. MARTÍN-ESTEVE, y F. CALVET: *R. esp. Fisiol.*, **20**, 165, 1964.
17. MARTÍN-ESTEVE, J., J. BOZAL y F. CALVET: *Arch. Interamer. Rheumat.*, **7**, 456, 1964.
18. NASAYUKI ISA, N., G. HAYACHI y J. KOWA: *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **64**, 108, 1968.
19. RAJAGOPALAN, K. V., y P. HANDLER: *J. Biol. Chem.*, **242**, 18, 4097, 1967.
20. RAMIA, J., J. BOZAL y F. CALVET: *R. esp. Fisiol.*, **22**, 85, 1966.
21. REMY, G., D. A. RICHERT, R. J. DOISY, I. C. WELLS y W. W. WESTERFELD: *J. Biol. Chem.*, **217**, 293, 1955.
22. RUNDLES, R. W., J. B. WYNGAARDEN, G. H. HITCHINGS, G. B. ELION y H. R. SILBERMAN: *Trans. Ass. Amer. Physns*, **76**, 126, 1963.
23. RUNDLES, R. W.: *Bull. Rheum. Dis.*, **16**, 400, 1966.
24. SEEGMILLER, J. E.: *Proc. Roy Soc. Med.*, **59**, 292, 1966.
25. SPECTOR, T., y D. G. JOHNS: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **32**, 1039, 1968.
26. WATTS, R. W. E.: *Proc. Roy Soc. Med.*, **59**, 287, 1966.
27. WATTS, R. W. E., J. E. M. WATTS, y J. E. SEEGMILLER: *J. Lab. clin. Med.*, **66**, 688, 1965.

