

El ácido úrico aceptor electrónico de la XDH de hígado de pollo

V. López-Solanas y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Barcelona

(Recibido el 21 de marzo de 1975)

V. LOPEZ-SOLANAS and J. BOZAL. *Uric Acid as Electronic Acceptor of Chicken Liver's XDH*. Rev. esp. Fisiol., 31, 255-264. 1975.

Uric acid seems to act as an electronic acceptor in the dehydrogenation of hypoxanthine catalyzed by chicken liver's xanthine dehydrogenase (XDH).

Oxidation was observed in crude homogenates under anaerobic conditions, although dialyzed homogenates or purified hepatic XDH also induce a similar action either in aerobic or anaerobic conditions.

The reaction pH optimum is about 6.0. Xanthine appears to be the only inhibited product of the reaction when its concentration is greater than 1×10^{-4} M.

When hypoxanthine and uric acid concentrations exceed 2×10^{-3} M and 1×10^{-4} M, respectively, they induce inhibition by substrate. Purine is a fairly good substrate of XDH when uric acid acts as acceptor. Allopurinol inhibits hypoxanthine oxidation by uric acid in the presence of XDH.

XDH also catalyzes the dismutation of xanthine to hypoxanthine and uric acid.

En la incubación en anaerobiosis de los homogeneizados de hígado de pollo, adicionados de hipoxantina, el ácido úrico endógeno desaparece progresivamente.

Las aves son animales uricotélicos, el ácido úrico es el producto final de excreción del catabolismo de las purinas y en ellas no se ha descrito la presencia de uricasa. Procede el metabolito de la oxidación de la hipoxantina y de la xantina catalizada por la xantindeshidrogenasa (XDH) con el concurso del NAD (14); el enzima utiliza también *in vitro* como aceptores el azul de metileno (20), el 2,6-DCI (19) y las sales de tetrazolio (21). La acti-

vidad de la XDH de hígado de pollo con el oxígeno es muy reducida (17), pero el enzima de hígado de mamíferos lo utiliza como aceptor fisiológico y por ello se designa como xantinoxidasa (E.C. 1.2.3.2).

La ausencia de uricasa en el hígado de pollo y el que este enzima precise de oxígeno para su actuación, ponen de relieve que la desaparición del ácido úrico, antes mencionada, debe reconocer otras causas. La destrucción que se describe en el presente trabajo tiene lugar tanto en condiciones aerobias como anaerobias y se precisa siempre de la presencia de hipoxantina.

Se ha descrito que la xantinoxidasa de leche (9) cataliza la reacción de dismutación de la xantina en hipoxantina y ácido úrico, pero sólo en condiciones anaerobias, ya que al trabajar en presencia de oxígeno la xantina se transforma en ácido úrico. La XDH de hígado de pollo (16), por su parte, no provoca la reacción en idénticas circunstancias.

La XDH de *Micrococcus lactilyticus* (23), que utiliza a la ferredoxina como aceptor electrónico, pero no al NAD, es capaz de catalizar la dismutación de la xantina en condiciones aerobias y anaerobias y la reacción es reversible en ambas condiciones.

La XDH de *Clostridium cylindrosporum* (2), enzima que tampoco utiliza el NAD y se diferencia notablemente del enzima de la leche y de las aves, cataliza la dismutación de la xantina y también la reducción de ácido úrico a xantina. La XDH de riñón de pollo no cataliza la reacción de dismutación (12) y al igual que el de hígado utiliza al NAD.

En el presente trabajo se estudian las condiciones en que tiene lugar la reacción de destrucción del ácido úrico en presencia de hipoxantina, a fin de poder determinar los productos resultantes de la misma, su naturaleza enzimática e identificar el enzima responsable de la transformación catalítica del ácido úrico.

Material y métodos

Preparación de homogeneizados y purificados. El hígado de pollo se obtuvo por decapitación, sangrado y evisceración inmediata del ave. Los homogeneizados se prepararon suspendiendo fragmentos del tejido en tampón de fosfato sódico 0,05 M, de pH 7,4 ó 6, en la proporción de 1 g de tejido y 4 ml de tampón; el conjunto se trituroó, mediante un homogeneizador de cuchillas, a la temperatura de 4-5° C. La diálisis de los homogeneizados se efectuó en sacos de celofana (Visking Sausage NO JAX 32), se pro-

longó durante 24 ó 48 horas a 5° C, frente al tampón de fosfatos ya citado.

Los preparados enzimáticos parcialmente purificados se obtuvieron por separación de las distintas fracciones celulares, utilizando el método de centrifugación diferencial de HOGEBOM (10). Se recogió la fracción que contiene las proteínas solubles y se llevó a 60 % de saturación en sulfato amónico; el precipitado obtenido se separó por centrifugación a $700 \times g$, durante 30 minutos, a 0° C; se disolvió en el tampón de fosfatos y se dializó durante 24 horas frente al mismo tampón, hasta eliminación de sulfatos.

Determinación de actividades. Para determinar la capacidad de destrucción del ácido úrico se prepararon mezclas que contenían homogeneizado o preparado purificado, hipoxantina, y a las que se adicionó ácido úrico cuando se trabajó con homogeneizados dializados o con purificados. Las incubaciones se efectuaron en matraces de 50-100 ml, provistos de tubo abductor y de salida para permitir el burbujeo de oxígeno o de aire, según fuesen las experiencias en aerobiosis o en atmósfera de nitrógeno, atravesando éste previamente por pirogalol al 30 %. La temperatura de incubación fue de $30 \pm 0,1$ ° C.

Se extrajeron volúmenes de 4-8 ml, a los intervalos de tiempo prefijados, y se vertieron sobre 1-2 ml de disolución de HClO_4 al 5 %, respectivamente; al cabo de 15 minutos se separó por filtración el precipitado proteico y en los filtrados se determinó el contenido de ácido úrico o de bases púricas, en su caso.

El contenido en ácido úrico se midió con el reactivo de BROWN (3), por lectura de las coloraciones azules en un fotocolorímetro Spectronic 70, a $\lambda = 690$ nm. La xantina y la hipoxantina se determinaron mediante una adaptación del método espectrofotométrico diferencial de KALCKAR (11); las medidas se efectuaron a $30 \pm 0,1$ ° C, en un espectrofotómetro Beckman DB-GT, en cubetas de 3 ml y 1 cm de

paso de luz, frente a un blanco de tampón de fosfato sódico 0,05 M y pH 7.4. La actividad xantindeshidrogenásica, con NAD, se estableció por medida de la velocidad inicial de formación de NADH, a $\lambda = 340$ nm, a $30 \pm 0,1^\circ$ C, frente a un blanco del tampón de fosfatos ya citado.

El contenido proteico de las disoluciones se determinó por medida espectrofotométrica de sus extinciones a $\lambda = 280$ nm (13); el coeficiente de extinción empleado es una unidad de densidad óptica por mg de proteína enzimática presente en 1 ml de disolución contenida en una cubeta de 3 ml de volumen y 1 cm de paso de luz.

Identificación de los productos de la reacción. La presencia de ácido dialúrico se investigó sobre placas de silicagel F-254, con indicador de fluorescencia y un eluyente constituido por ter-butanol-metiletilcetona-ácido acético glacial-amoniaco (25 %) (40-30-20-10). Las manchas se revelaron a $\lambda = 254$ nm (lámpara Desaga-Uvis). La presencia de pteridinas y de 4,5-diaminouracilo se investigó sobre papel Scheilar-Schull 2043 BM GL, utilizando como eluyente disolución de NH_4Cl al 3 %, o una mezcla de butanol-etilenglicol-agua (4-1-1); las manchas se observaron a 254 nm y 366 nm.

La hipoxantina, la xantina y el ácido úrico se investigaron sobre placas de celulosa; los eluyentes empleados fueron metanol-ácido fórmico-agua (8-1,5-0,5) (A) o bien metanol-etilenglicol-agua (4-1-1) (B). El revelado se efectuó a $\lambda = 254$ nm.

Resultados

Incubación de homogeneizados de hígado. La incubación en anaerobiosis (atmósfera de nitrógeno) de homogeneizados crudos de hígado de pollo, en medio tamponado de fosfatos 0,05 M, de pH 7,4, conteniendo 62,5 mg tejido/ml, a los que se adicionó hipoxantina (1×10^{-3} — $2,5 \times 10^{-3}$ M), 3 a $30 \pm 0,1^\circ$ C, provoca la desaparición progresiva del ácido úrico

endógeno que es más acusada con la concentración superior de hipoxantina. En una incubación de 60 minutos, 1,68 μmol de ácido úrico se reducen a 0,42 y 0,22 μmol , en presencia de las concentraciones inferior y superior de hipoxantina citadas. Las determinaciones se efectuaron por el método colorimétrico. Los mismos homogeneizados al ser incubados sin adición de hipoxantina, en aerobiosis o anaerobiosis, producen ácido úrico que proviene de la oxidación de la hipoxantina y la xantina endógenas con el concurso del NAD, en reacción catalizada por la XDH. Asimismo, en la incubación en aerobiosis de los homogeneizados crudos adicionados de hipoxantina aparece siempre ácido úrico.

La desaparición de ácido úrico observada en la incubación en anaerobiosis de los homogeneizados crudos adicionados de hipoxantina, se muestra como un fenómeno inducido peculiarmente por la mencionada purina, ya que al efectuar incubaciones de los homogeneizados anteriormente descritos en presencia de xantina (2×10^{-4} a 1×10^{-3} M) o de alopurinol (hasta 10^{-4} M) la cantidad de ácido úrico endógeno permanece constante.

Influencia del pH en la desaparición de ácido úrico. Al incubar en anaerobiosis del modo habitual, homogeneizados crudos (62 mg hígado/ml), adicionados de hipoxantina (1×10^{-3} M) y de ácido úrico (1×10^{-4} M), el máximo de desaparición de éste ocurre a pH 6. La actividad desciende a pH 5,5 y se anula a pH 8,5 (tampón de boratos 0,05 M).

Incubación aerobia y anaerobia de homogeneizados dializados. Los homogeneizados de hígado de pollo dializados (24-48 horas) frente a tampón de fosfatos 0,05 M, de pH 7,4 ó 6, adicionados de hipoxantina (1×10^{-3} M) y de ácido úrico (1×10^{-4} M), al ser incubados a ambos pH, en atmósfera de nitrógeno, de oxígeno o en corriente de aire, provocan la desaparición del ácido úrico adicionado (tabla I).

Tabla I. *Digestión del ácido úrico por los homogeneizados dializados.*

Concentraciones iniciales: hipoxantina, 10^{-3} ; ácido úrico, 10^{-4} M; 62,5 mg de hígado/ml; incubación a pH 6; temperatura = $30 \pm 0,1^\circ$ C; homogeneizado dializado 24 horas a pH 7,4.

Incubación min.	Atmósfera de O ₂	Atmósfera de N ₂	Corriente de aire
0	1,59 *	1,59 *	1,59 *
15	1,14	1,15	1,17
30	0,85	0,81	0,82
60	0,74	0,74	0,74

* μ mol ácido úrico residual/g hígado.

Localización celular de la actividad enzimática. El fraccionamiento de los homogeneizados de hígado de pollo por el método de HOGEBOOM (*loc. cit.*), pone de manifiesto que la actividad enzimática en estudio se halla localizada en el sobrenadante obtenido por centrifugación a $20.000 \times g$, durante 10 minutos (tabla II). La actividad de cada una de las fracciones, que previamente habían sido dializadas frente al tampón de fosfatos 0,05 M de pH 7,4, se determinó en condiciones aerobias a pH 6 y $30 \pm 0,1^\circ$ C, en presencia de ácido úrico (1×10^{-4} M) y de hipoxantina (1×10^{-3} M); el ácido úrico residual se midió colorimétricamente. La fracción separada a $20.000 \times g$ se lleva al 60 % de saturación con sulfato amónico y el precipitado obtenido exhibe la capacidad de eliminar el ácido úrico que se ha

descrito; su actividad específica es de $8,3 \times 10^{-4}$ μ mol ácido úrico/min/mg proteína; el rendimiento de obtención es del 85 % y representa un grado de purificación de 4,5 veces respecto al homogeneizado inicial. El precipitado así obtenido se empleará en las experiencias sucesivas.

Variación de la actividad de los purificados con la concentración de hipoxantina y de ácido úrico. La incubación de los homogeneizados crudos de hígado mostraba que su capacidad de destrucción de ácido úrico dependía de la concentración de hipoxantina. Se ha procedido a determinar la influencia que las concentraciones de la base púrica y del ácido úrico ejercen sobre la actividad del purificado parcial descrito precedentemente. La incubación se efectuó con muestras que contenían una cantidad de purificado equivalente a 0,208 g tejido/ml, a pH 6 y $30 \pm 0,1^\circ$ C. En las experiencias para establecer la influencia de la hipoxantina, sus concentraciones estuvieron comprendidas entre 1×10^{-4} y 5×10^{-3} M y la del ácido úrico fue de 1×10^{-4} M. El máximo de actividad aparece cuando la concentración de hipoxantina es 2×10^{-3} M; las concentraciones superiores provocan inhibición por exceso de sustrato.

Para establecer la influencia de la concentración de ácido úrico sus concentraciones fueron de 1×10^{-6} a 5×10^{-4} M, y la de hipoxantina de 2×10^{-3} M. La

Tabla II. *Actividad de las fracciones celulares hepáticas de pollo.*

Fracción	Contenido total proteico mg	Actividad específica*	Actividad global	Rendimiento %	Grado de purificación
Homog. inicial	30.952	0,47	1,45	100	
Sobr. F _S -700	16.244	0,80	13,0	90	1,7
Res. F _X	8.667	0,23	0,19		
Sobr. F _S -8.000	6.171	1,86	1,14	79	3,9
Res. F _X	9.628	0,05	0,05		
Sobr. F _S -20.000	4.968	1,86	0,92	63	3,9
Res. F _X	1.101	—	—		

* $\frac{\mu\text{mol ácido úrico}}{\text{min/mg prot.}} \times 10^4$

velocidad de desaparición de ácido úrico es máxima si su concentración es de 1×10^{-4} M y también induce inhibición por exceso de sustrato cuando la concentración es superior.

pH óptimo de actuación de los purificados. El pH óptimo de la actividad de los purificados, incubados en aerobiosis, con hipoxantina (2×10^{-3} M) y ácido úrico (1×10^{-4} M) se encuentra entre 5,4 y 7, observándose el máximo a 6. La actividad se anula prácticamente cuando el pH es de 4 y 8. Además del tampón de fosfatos habitual, 0,05 M, se ha empleado también tampón de citratos de igual molaridad para trabajar a pH inferior a 6,9; el tampón no ejerce influencia sobre la actividad que se determina. La concentración de hipoxantina a la que se observa la máxima actividad a pH 6, es 2×10^{-3} M.

Identificación de los productos de la reacción de desaparición del ácido úrico. Se han identificado los productos resultantes de la incubación en aerobiosis, durante 150 minutos, de mezclas que contenían purificados de hígado (equivalentes a 0,208 g hígado/ml), adicionados de hipoxantina (2×10^{-3} M) y de ácido úrico (1×10^{-4} M), a pH 6, en el medio de tampón fosfatos habitual. Al final del in-

tervalo se sometió el conjunto a diálisis frente a agua destilada, durante 24 horas, a 4° C; los líquidos de diálisis reunidos se concentraron a vacío (17 mm Hg a 40° C) en un rotavapor. El residuo se disolvió en 5 ml de agua destilada y se utilizó para la identificación cromatográfica de los productos de reacción.

No se ha identificado la presencia de posibles productos de la hidrólisis del ácido úrico, como el ácido dialúrico (1) o las pteridinas (15), ni de 4,5-diaminouracilo, que se ha postulado en un intermediario en la formación de aquéllas. La transformación de la hipoxantina y del ácido úrico en xantina se ha identificado efectuando la cromatografía sobre placas de celulosa, con los eluyentes (A) y (B). Los valores de Rf del ácido úrico, la hipoxantina y la xantina son de 0,14, 0,34 y 0,22, respectivamente (eluyente A) y de 0,19, 0,42 y 0,30 (eluyente B).

La determinación cuantitativa de las tres purinas, en los filtrados perclóricos procedentes de la incubación anaerobia de los homogeneizados dializados o bien de purificados a los que se adicionó hipoxantina y ácido úrico, pone de manifiesto que la desaparición de un mol de cada uno de ellos da lugar a la formación de dos moles de xantina (tabla III). Los resultados descritos inducen a suponer que el enzima responsable de la transforma-

Tabla III. *Conversión del ácido úrico y de la hipoxantina en xantina.* Concentraciones iniciales: ácido úrico 1×10^{-4} M; hipoxantina 2×10^{-3} M; 0,208 g hígado/ml; pH 6,0; incubación en anaerobiosis a $30 \pm 0,1$ ° C. Los valores representan incrementos en $\mu\text{mol/g}$ hígado. El control estaba constituido por un homogeneizado dializado o un purificado sin ninguna adición.

Incubación min.	Muestras	Acido úrico	Homogeneizados Hipoxantina	Xantina	Acido úrico	Purificados Hipoxantina	Xantina
90	Incubado	-1,57	-2,65	7,29	-1,38	-1,76	3,37
	Control	1,10	0,00	1,90	0,32	0,00	0,00
	Incubado-control	-2,67	-2,65	5,39	-1,70	-1,76	3,37
180	Incubado	-2,10	-2,40	9,80	-1,91	-2,52	5,27
	Control	1,60	1,20	2,50	0,62	0,00	0,00
	Incubado-control	-3,70	-3,60	7,30	-2,53	-2,52	5,27

ción del ácido úrico en presencia de hipoxantina, es la xantindeshidrogenasa de hígado, presente en los homogeneizados y en los purificados; se halla localizada en la fracción celular (4, 18) separada a $20.000 \times g$.

La XDH de hígado de pollo utiliza diversos aceptores electrónicos (14, 17, 19, 21) en la oxidación de la hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico; en la transformación que se describe ahora la hipoxantina es oxidada a xantina y el ácido úrico desempeña el papel de aceptor electrónico.

Identificación del enzima que cataliza la reacción. A fin de comprobar que la XDH de hígado de pollo es el enzima que cataliza la oxidación de la hipoxantina en presencia de ácido úrico, se procedió al fraccionamiento de los homogeneizados de hígado de pollo. En cada una de las fracciones se determinaron dos actividades: una con ácido úrico e hipoxantina y la otra con xantina y NAD, esta última es característica de la XDH de hígado de pollo. El homogeneizado de partida estaba constituido por 1 g de órgano en cada 9 ml de tampón de fosfatos 0,05 M de pH 6, y se sometió a un tratamiento térmico a 50°C durante 20 minutos. Por centrifugación a $4.500 \times g$ durante 30 minutos se separa un residuo que es inactivo y un sobrenadante activo. El sobrenadante se precipita con acetona hasta alcanzar una concentración del 35 % en volumen. Por centrifugación a $4.500 \times g$ durante 30 minutos se separa un sobrenadante inactivo. El residuo se disuelve en tampón de fosfatos 0,05 M de pH 7,4 y se precipita con sulfato amónico al 35 % de saturación. Se obtiene un sobrenadante activo que se lleva al 60 % de saturación en la sal y el precipitado así obtenido retiene toda la actividad XDH. Las dos actividades de cada una de las fracciones se hallan en una relación constante, cuyo valor promedio es de 32,74 (tabla IV). La constancia de la relación de las actividades en

Tabla IV. *Actividades respecto al ácido úrico y NAD de las fracciones.*

Concentraciones: ácido úrico = 1×10^{-4} M; NAD = 1×10^{-4} M; hipoxantina = 2×10^{-3} M; xantina = 1×10^{-4} M.

Etapa	Aceptor electrónico		Act. con NAD
	Acido úrico	NAD	Act. con úrico
Homog. inicial	3,33 *	104,40 *	31,35
Sob. trat. térmico	1,23	41,40	33,36
Res. prec. con acetona	1,23	41,76	33,95
Sob. prec. (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,35	1,23	41,76	33,95
Sob. prec. (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,60	1,18	36,72	31,12

* $\frac{\mu\text{mol úrico} \times 10^3}{\text{min.} \times \text{g hígado}}$

todo el proceso de fraccionamiento es prueba de que ambas son atribuibles al mismo enzima, es decir, a la XDH.

Dismutación de la xantina catalizada por la XDH. La reacción entre la hipoxantina y el ácido úrico, catalizada por la XDH de hígado de pollo es reversible; en efecto, el enzima es capaz de dismutar la xantina en hipoxantina y ácido úrico, tanto si se trabaja con homogeneizados dializados como con preparados parcialmente purificados (tabla V). Las incubaciones se efectuaron en anaerobiosis, ya que en presencia de aire se hace difícil detectar la hipoxantina formada, la cual se oxida de nuevo a xantina. Se observa de nuevo que al incubar homogeneizados dializados aparecen bases púricas procedentes de la degradación de nucleoproteínas. En la transformación, dos moles de xantina originan un mol de hipoxantina y otro de ácido úrico; indicando que la xantina actúa, a la vez, como substrato y como aceptor electrónico.

Tabla V. *Dismutación de la xantina por la XDH de hígado de pollo.*
Concentraciones iniciales: xantina 1×10^{-3} M; 0,208 g hígado/ml; pH 7,4. Los valores representan incrementos en $\mu\text{mol/g}$ hígado. El control estaba constituido por un homogeneizado dializado o un purificado sin ninguna adición.

Incubación min.	Muestras	Xantina	Homogeneizados		Xantina	Purificados	
			Acido úrico	Hipoxantina		Acido úrico	Hipoxantina
90	Incubado	-1,15	1,10	1,63	-0,83	0,43	0,47
	Control	1,05	0,00	0,57	0,00	0,00	0,03
	Incubado-control	-2,20	1,10	1,10	-0,83	-0,43	0,44
180	Incubado	-1,82	1,53	2,14	-1,39	0,76	0,83
	Control	1,15	0,00	0,72	0,00	0,00	0,06
	Incubado-control	-2,92	1,53	1,42	-1,39	0,76	0,77

Acción de la XDH de hígado de pollo sobre otras purinas en presencia de ácido úrico. En la incubación de mezclas de purificado parcial de XDH, con un contenido equivalente a 104 mg hígado/ml, en aerobiosis y en anaerobiosis, a pH 6, adicionados de purina (2×10^{-3} M) y de ácido úrico (1×10^{-4} M), desaparece este último: 0,96 μmol de ácido úrico se reducen a 0,30 μmol al cabo de 40 minutos de incubación. La extensión de la reacción es idéntica en ambas condiciones. Experiencias análogas efectuadas con adenina (2×10^{-3} M) muestran que no actúa como sustrato en aquellas condiciones, ni tampoco al emplear homogeneizados crudos en condiciones anaerobias.

Inhibiciones por xantina y por alopurinol. La xantina (5×10^{-4} a 1×10^{-3} M) y el alopurinol (5×10^{-5} a 2×10^{-3} M) inhiben la transformación de la hipoxantina en xantina por el ácido úrico en presencia de XDH; las concentraciones superiores de ambos inhibidores provocan inhibiciones del 64 y del 100 %, respectivamente. El alopurinol es sustrato de la XDH cuando el aceptor es el metasulfato de fenacina (22) e inhibidor del enzima con NAD (8).

Discusión

La incubación anaerobia de homogeneizados crudos de hígado de pollo, adi-

cionados de hipoxantina, provoca la desaparición del ácido úrico endógeno y el fenómeno no sucede al sustituir aquella por la xantina o el alopurinol, lo que muestra que la transformación es inducida por la hipoxantina. Por su parte, los homogeneizados dializados a los que se adiciona hipoxantina y ácido úrico destruyen a este último, tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

El pH óptimo de la reacción es 6 y ésta se anula a pH 8,5 (óptimo de la uricasa renal bovina). Los hechos sugieren que la desaparición del ácido úrico en presencia de hipoxantina ocurre en una reacción enzimática distinta de la catalizada por la uricasa o por cualquier oxidasa.

En la cromatografía de los productos de la reacción no se identifican sustancias que son habituales en la hidrólisis no enzimática del ácido úrico, tales como el ácido dialúrico (1) o el 4,5-diamino-uracilo intermediario en la formación de pteridinas o bien de estas últimas (15). El único producto de la reacción es la xantina; aparece ésta acompañada de la hipoxantina y del ácido úrico que no han sido transformados. La posibilidad de la oxidación de la hipoxantina por el ácido úrico se deduce del valor de los potenciales estándar redox, a pH 7 (9), de los pares hipoxantina/xantina = 0,371V y xantina ácido úrico = 0,361V.

La determinación cuantitativa de los productos de reacción demuestra que un mol de hipoxantina y otro de ácido úrico se transforman en dos moles de xantina.

Los resultados comentados permiten postular que el enzima que cataliza la reacción es la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo que utiliza al ácido úrico como aceptor electrónico. En la obtención de un purificado de XDH la relación de las actividades con NAD, a pH 7,4, o con ácido úrico e hipoxantina a pH 6, se mantiene constante en todas las fracciones, siendo la primera 32 veces superior.

La actividad de la XDH con hipoxantina y ácido úrico es inhibida por exceso de ambos sustratos y por la xantina, producto de la reacción. La formación de xantina mediante la reacción comentada puede contribuir a explicar su acumulación cuando la hipoxantina (1×10^{-4} M o superior) se oxida con el concurso del azul de metileno (7) o del oxígeno (6), ya que bastan pequeñas concentraciones de ácido úrico (1×10^{-8} M) para que se observe la reducción de la hipoxantina.

Al incubar homogeneizados de hígado de pollo dializados o preparados purificados de XDH, a pH 7,4, en anaerobiosis, la xantina adicionada se dismuta en hipoxantina y ácido úrico, en contraposición a lo postulado con la XDH de hígado (16) y de riñón de pollo (12). La reacción comentada puede explicar el incremento de velocidad observado cuando la XDH cataliza la oxidación de la xantina (1×10^{-3} M o superior) en presencia de oxígeno (17), ya que podrían producirse simultáneamente ambas transformaciones. Por el contrario, cuando el NAD es el aceptor electrónico se observa inhibición por exceso de xantina (7). El significado fisiológico de la dismutación de la xantina es dudoso, ya que las aves carecen de la ruta metabólica de recuperación de hipoxantina y la XDH no controla la síntesis de purinas del modo que lo hace la xantinoxidasa de mamíferos (5).

La purina, sustrato de la XDH con

NAD (6), actúa como tal cuando el ácido úrico es el aceptor electrónico; la hipoxantina es mejor sustrato pero la diferencia de actividades no es tan acusada como en presencia de NAD.

Resumen

La XDH de hígado de pollo cataliza la oxidación de la hipoxantina utilizando el ácido úrico como aceptor electrónico. La reacción tiene lugar al trabajar con homogeneizados crudos de hígado en medio anaerobio y con homogeneizados dializados (24 horas) o con purificados de XDH, tanto en medio anaerobio como en aerobio.

El único producto de la reacción es la xantina, que provoca inhibición de la transformación si su concentración es superior a 1×10^{-4} M.

El pH óptimo de la reacción es 6. Concentraciones de hipoxantina y de ácido úrico superiores a 2×10^{-3} M y 1×10^{-4} M, respectivamente, inhiben a la XDH por exceso de sustrato. La purina es sustrato de la XDH en presencia de ácido úrico como aceptor electrónico. El alopurinol es inhibidor de la oxidación de hipoxantina por ácido úrico en presencia de XDH.

La XDH de hígado de pollo cataliza la dismutación de la xantina en ácido úrico e hipoxantina.

Bibliografía

1. BEILSTEINS: En «Handbuch der Organischen Chemie», Vol. 25 (4.ª edic.) (F. Richter, ed.). J. Springer, Berlín, 1936, pág. 85.
2. BRADSAW, W. H. y BARKER, H. A.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 3620, 1960.
3. BROWN, H.: *J. Biol. Chem.*, **158**, 602, 1945.
4. DEDUVE, C., WATTLAUX, A. y BAUCHUIN, P.: *Advances in Enzymology*, **24**, 291, 1962.
5. DELAPP, N. W. y FISHER, J. R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **269**, 505, 1972.
6. DOMINGO, E., BOZAL, J. y CALVET, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **25**, 275, 1969.
7. DOMINGO, E., BOZAL, J. y CALVET, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **23**, 145, 1967.
8. ESCARMIS, C., BOZAL, J. y CALVET, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **26**, 109, 1970.
9. GREEN, D. E.: *Biochem. J.*, **28**, 1550, 1934.

10. HOGEBOOM, C. H., SCHNEIDER, W. C. y STREIBICH, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 3544, 1960.
11. KALCKAR, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 429, 1947.
12. LANDON, J. E. y CARTER, E.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 819, 1960.
13. MALCON, D. y WEBB, C. E.: *Enzymes*. Academic Press, Nueva York, 1958, página 39.
14. MORELL, D. B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 221, 1955.
15. PFLEIDERER, W.: *Chem. Ber.*, **92**, 2468, 1959.
16. PRIEST, D. G. y FISHER, J. R.: *Eur. J. Biochem.*, **10**, 439, 1969.
17. RAJAGOPALAN, K. V. y HANDLER, P.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 4097, 1967.
18. REID, E.: En «*Biochemist Handbook*» (C. Long, ed.), F. N. Spon, Londres, 1961, pág. 814.
19. REMY, C. N., RICHERT, D. A. DOISY, J. R., WELLS, Y. C. y WESTERFELD, W. W.: *J. Biol. Chem.*, **217**, 293, 1955.
20. RICHERT, D. A. y WESTERFELD, W. W.: *Proc. Soc. Exptl. Biol., N.Y.*, **76**, 252, 1951.
21. SCHWARTZ, H. G. y LITWACK, G.: *Nature*, Londres, **180**, 761, 1957.
22. SPECTOR, T. y JOHNS, D. G.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **32**, 1039, 1968.
23. SUSAN, T. S., RAJAGOPALAN, K. V. y HANDLER, P.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 108, 1967.
24. WOODWARD, W. D., LEE, P. C., DELAPP, N. W. y FISHER, J. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 537, 1972.

