

## Estudio comparativo de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo y de la xantinoxidasa de hígado de buey. Actividad deshidrogenásica de la xantinoxidasa

E. Canela y J. Bozal

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Química  
Universidad de Barcelona  
Barcelona - 28

(Recibido el 15 de mayo de 1978)

E. CANELA and J. BOZAL. *Comparative Study of Chicken Liver Xanthine Dehydrogenase and Bovine Liver Xanthine Oxidase. Dehydrogenase Activity of Xanthine Oxidase.* Rev. esp. Fisiol., 35, 51-62. 1979.

A method to purify bovine liver xanthine oxidase is described, with which samples of 256-fold specific activity with respect to the initial homogenate are obtained.

Bovine liver xanthine oxidase and chicken liver xanthine dehydrogenase with oxygen as electron acceptor exhibit similar profile in  $pK_M$  and  $\log V$  versus pH plots. With  $NAD^+$  as electron acceptor a different profile in the  $pK_M$  xanthine plot is obtained for chicken liver xanthine dehydrogenase. However three inflection points at the same pH values appear in all plots.

Both enzymes are irreversibly inhibited by pCMB and reversibly by N-ethylmaleimide and by iodoacetamide, with competitive and uncompetitive type inhibitions respectively. These results suggest that  $NAD^+$  alters the enzymatic action since its binding to the enzyme antecedes the binding of xanthine to the xanthine oxidase molecule, without undergoing itself any modification.

0.15 M DTT or DTE treatment of bovine liver xanthine oxidase gives to the enzyme a permanent activity with  $NAD^+$  without modifying its activity with oxygen. The enzyme thus treated produces parallel straight lines in Lineweaver-Burk plots.

Los enzimas que catalizan la oxidación de la hipoxantina a xantina, y la de ésta a ácido úrico se denominan oxidasas si utilizan el oxígeno como aceptor electrónico preferente [xantina: oxígeno-oxidoreductasa (E.C. 1.2.3.2)], y deshidrogenasas cuando el principal aceptor electrónico es el  $NAD^+$  [xantina: $NAD^+$ -oxido-

rreductasa (E.C. 1.2.1.37)]; las primeras se localizan principalmente en los tejidos de los mamíferos y las segundas en los de las aves (12).

Se ha postulado que la molécula de las xantinoxidasas y de las xantindeshidrogenasas es de naturaleza dimérica (2, 17, 18), habiéndose propuesto que ambos en-

zimas ajustan su actuación a un mecanismo de tipo *ping-pong*, aspecto que todavía se halla en discusión (3) También que la xantinoxidasa de hígado de rata se comporta como deshidrogenasa (forma D) (8) y que ésta se transforma en la forma O, que es capaz de emplear el oxígeno como aceptor electrónico, al tratar la primera con reactivos característicos de los grupos —SH, por incubación con proteasas, o por el almacenamiento; el fenómeno se invierte mediante tratamiento con ditioneína, siempre que la transformación no se haya provocado por acción proteolítica o por tratamiento con N-etilmaleimida (8, 16).

WAUD *et al.* (17, 18) han puesto de manifiesto la existencia de 28 grupos SH en la xantinoxidasa nativa de hígado de rata al igual que en la forma O obtenida mediante calefacción; cuando esta última se produce por proteólisis únicamente contiene 8 grupos SH. Los autores proponen que los grupos SH son, en algunos casos, vecinales y que la calefacción a 37° C produce únicamente la distorsión de la molécula. Se ha sugerido que la xantinoxidasa de hígado humano experimenta también dichas transformaciones (7, 8), si bien no existe evidencia experimental de dicho fenómeno.

En el presente trabajo, se compara el comportamiento de la xantinoxidasa de hígado de buey, que no exhibe actividad con el NAD<sup>+</sup>, con el de xantinoxidasa de hígado de pollo, cuya relación de actividades con oxígeno y con NAD<sup>+</sup> es de 0.02 (4). Para ello, se han determinado los grupos ionizables del enzima de ambas procedencias por el método de Dixon (9, 10) y su comportamiento frente a diversos reactivos de los grupos SH. Se establecen, también, las condiciones en que es posible inducir actividad con NAD<sup>+</sup> en la xantinoxidasa de hígado de buey por la acción de reactivos reductores de puentes disulfuro, y la posibilidad de incrementar en la xantinoxidasa de hígado de pollo la relación de

actividades oxígeno/NAD<sup>+</sup> por la acción de diversas proteasas.

### Material y métodos

Los reactivos empleados han sido: hipoxantina, xantina y iodoacetamida (Merck); NAD<sup>+</sup> y NADH (Boehringer); ditioneína y ditioneína (Sigma); p-cloromercuribenzoato (Fluka); 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (Calbiochem); N-etilmaleimida (Aldrich-Europe); tripsina y  $\alpha$ -quimotripsina (Worthington); subtilisina (Carlsberg).

La xantinoxidasa de hígado de pollo se ha obtenido por el método descrito por GUBERT y BOZAL (11) con una actividad específica del preparado de 18 U/mg de proteína, que equivale a 144 U/g de purificado.

*Purificación de la xantinoxidasa de hígado de buey.* El tejido hepático obtenido en el matadero local, del que se han separado adherencias grasas y tejido conectivo, se lava con disolución de sacarosa 0,25 M y se tritura en un homogeneizador de Potter-Elvehjem con la misma disolución en la proporción 1/8 (p/v). El homogeneizado se centrifuga a 15.000  $\times$  g, 60 min a 4° C. Al sobrenadante se le adiciona tampón de fosfato sódico 0,5 M, pH 7,4 (1 ml de tampón/9 ml de sobrenadante) y se somete a calefacción, 56° C 30 min. La suspensión se enfría a 4° C y se centrifuga a 3.000  $\times$  g, 15 min. Al sobrenadante se le añaden 43 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sólido por cada 100 ml de disolución, la suspensión se agita durante 50 minutos y se conserva en reposo 8 horas a 4° C; por último, se centrifuga a 5.000  $\times$  g, 30 min a 4° C. El residuo obtenido se disuelve en tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, en la proporción 1/5 (p/v) y se le añaden 14 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por cada 100 ml de disolución, se centrifuga en las condiciones habituales y se descarta el residuo inactivo. Se añaden al sobrenadante 35 g

Tabla I. Purificación de la xantina oxidasa.

Etapa de purificación	Acti- vidad* total (U)	Pr teina total (mg) Acti-	Acti- vidad es- pecífica (U/mgP)
Homogeneizado	3.120	37.590	0,083
Sobrenadante			
15.000 × g	2.950	17.998	0,164
Sulfato amónico	2.162	649	3,33
Mezcla eluidos			
DEAE-celulosa	486	37,8	12,87
Mezcla eluidos			
Sephadex G-200	296	13,9	21,28

\* Unidad de xantina oxidasa = 1  $\mu$ mol de ácido úrico transformado/min a  $30 \pm 0,1^\circ$  C, pH 7,4 en tampón de fosfato sódico 50 mM y con xantina 50  $\mu$ M.

de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por cada 100 ml, recogién- dose por centrifugación (5.000 × g, 30 minutos) un precipitado que contiene la actividad xantina oxidásica. El precipitado se disuelve en la mínima cantidad de tam- pón de fosfato sódico 1 mM, pH 7,4 y se dializa frente al mismo tampón durante 12 horas a 4° C. El dializado se somete a cromatografía en columna (2,5 × 50 cm) de DEAE-celulosa (Whatman DE-23), se efectúa una primera elución por lavado con disolución de fosfato sódico a 1 mM, pH 7,4, hasta ausencia de proteína en los eluidos. A continuación se aplica un gradiente de concentración de fosfato sódico, formado por 400 g de disolución 1 mM en dicha sal y 400 g de disolución 0,1 M en fosfato sódico, ambas de pH 7,4. Las fracciones activas se reúnen y se concentran por diálisis frente a sacarosa 1:1 (p/v) hasta que la viscosidad de la fracción activa sea 1,75 veces superior a

la del agua (aproximadamente 6 horas). A continuación, la fracción concentrada se fracciona en una columna (3 × 70 cm) de Sephadex G-200, la elución se efectúa con disolución de fosfato sódico 50 mM de pH 7,4, se reúnen las fracciones acti- vas; se añaden 43 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /100 ml y se separa el precipitado por centrifuga- ción, en las condiciones habituales, cuya actividad es 256 veces superior a la del homogeneizado de partida (tabla I). Su actividad específica es de 21,28 U/mg de proteína, equivalente a 178 U/g de puri- ficado. Su actividad enzimática con el oxígeno como aceptor electrónico se de- termina por lectura de los incrementos de absorbancia a 295 nm debidos al áci- do úrico producido. La actividad con  $\text{NAD}^+$  como aceptor electrónico, traba- jando en condiciones aerobias se midió por lectura a 340 nm de los incrementos de absorbancia debidos a la aparición de NADH. La actividad total exhibida por el enzima, al utilizar simultáneamente al oxígeno y al  $\text{NAD}^+$  como aceptores elec- trónicos, se determinó midiendo a 295 nm el incremento de absorbancia al que se sustrajo el incremento de absorbancia a 295 nm producido por la transformación de  $\text{NAD}^+$  a NADH (fórmula I); la apa- rición de NADH se midió por lectura de los incrementos de absorbancia a 340 nm. Las medidas de la absorbancia y de las velocidades iniciales de reacción se efectuaron en un espectrofotómetro Pye Unicam 1700, provisto de un registrador AR-25 (Philips), con cubetas de 1 cm de paso de luz termostatizadas a  $30 \pm 0$ ,

$$V_{\text{Total}} = \frac{\Delta \text{DO}^{295 \text{ nm}} - \left\{ \frac{\epsilon_{\text{NADH}}^{295 \text{ nm}} - \epsilon_{\text{NAD}^+}^{295 \text{ nm}}}{\epsilon_{\text{NADH}}^{340} - \epsilon_{\text{NAD}^+}^{340}} \right\} \times \Delta \text{DO}^{340}}{\epsilon_{\text{ác. úrico}}^{295} - \epsilon_{\text{xantina}}^{295}} : \text{tiempo}$$

(Fórmula I)

1° C. En las determinaciones de actividad total de las absorbancias simultáneas a 295 nm y 340 nm se determinaron con auxilio de los accesorios Unicam SP-1803 (selector de longitudes de onda) y Unicam SP-1805 (controlador de programa).

En todos los casos, salvo indicación contraria, la reacción se inició por adición de la disolución enzimática.

Al establecer las variaciones de  $pK_M$  y  $\log V_{m\acute{a}x}$  con el pH, se utilizó tampón de tris-fosfato 12,5 mM y fuerza iónica constante, 50 mM, proporcionada por adición de la cantidad necesaria de KCl.

## Resultados

*Efecto del pH sobre la actividad de la xantoxidasa de hígado de buey.* La actividad oxidásica de la xantoxidasa de buey, con xantina e hipoxantina como sustratos, es máxima a pH 8,4 (fig. 1).

Las representaciones de  $pK_M$  frente al pH en la oxidación de la xantina y de la hipoxantina en condiciones aerobias (figura 2) muestran un punto de inflexión común en el entorno de pH 6,0. Aparecen otros dos puntos de inflexión en la curva correspondiente a  $pK_M$  de la xantina cuyos valores de pH son inferiores

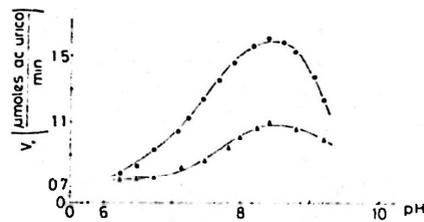


Fig. 1. pH óptimo de la xantinoxidasa de hígado de buey.

Mezcla de incubación 0,2 U/ml de xantinoxidasa; tampón tris-fosfato 50 mM. (○) [xantina]  $\mu\text{M}^{-1} = 50$ ; (△) [hipoxantina]  $\mu\text{M}^{-1} = 40$ .

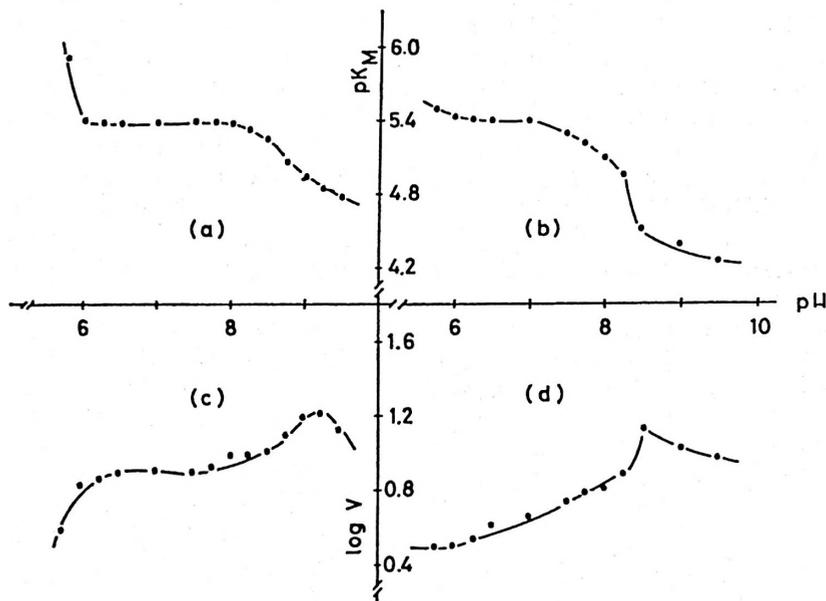


Fig. 2. Variación del  $pK_M$  y del  $\log V$  con el pH; sistema xantinoxidasa  $\text{O}_2$ . (a) y (b)  $pK_M$ ; (c) y (d)  $\log V$ . La cubeta de reacción contiene: 0,1 U/ml de xantinoxidasa. (a) y (c): [hipoxantina]  $\mu\text{M}^{-1} = 40, 30, 25$  y 5. (b) y (d): [xantina]  $\mu\text{M}^{-1} = 100, 80, 60, 25, 10$  y 5. Tampón tris-fosfatos 50 mM.

a los correspondientes a la hipoxantina, así como un punto de inflexión que no encuentra correspondencia en la curva de  $pK_M$  (hipoxantina).

Al representar  $\log V$  frente al pH (figuras 2c y 2d) las curvas correspondientes a la xantina e hipoxantina muestran tres puntos de inflexión que coinciden con los que aparecen en las representaciones de  $pK_M$  para ambos sustratos; sin embargo, la curva de  $pK_M$  correspondiente a la xantina (fig. 2b) muestra un punto de inflexión por encima de pH 9 sin co-

rrespondencia en la curva de  $\log V$  (figura 2d). Asimismo, en las representaciones de  $\log V$  frente al pH, para cada uno de los sustratos, aparece un máximo (a pH 8,4 para la xantina y a pH 9,0 para la hipoxantina), pero sólo el de la xantina coincide con el valor de pH al que el enzima exhibe la máxima actividad determinada frente a una sola concentración de sustrato (fig. 1).

*Efecto del pH sobre la actividad de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo.* El perfil de las representaciones de  $pK_M$  frente al pH, para la oxidación de la xantina, en presencia de  $NAD^+$  (condiciones aerobias), con respecto a la xantina (fig. 3a) y con respecto al  $NAD^+$  (figura 3c) son diferentes. Sin embargo, los puntos de inflexión aparecen a los mismos valores de pH y coinciden con los

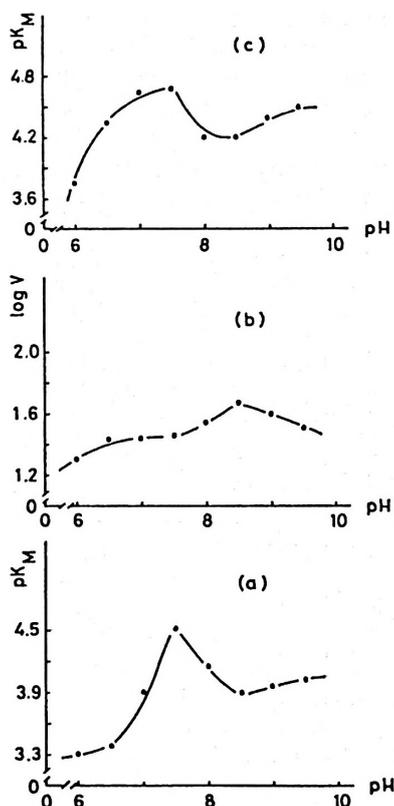


Fig. 3. Variación del  $pK_M$  y del  $\log V$  con el pH; sistema xantindeshidrogenasa- $NAD^+$  (a)  $pK_M$  ( $NAD^+$ ); (b)  $\log V$ ; (c)  $pK_M$  (xantina). La cubeta de reacción contiene: 0,16 U/ml de xantindeshidrogenasa.  $[NAD^+] \mu M^{-1} = 500, 400, 200, 100, 50, 25, 10$  y 5.  $[Xantina] \mu M^{-1} = 100, 80, 60, 50, 25, 10$  y 5. Tampón tris-fosfatos 50 mM.

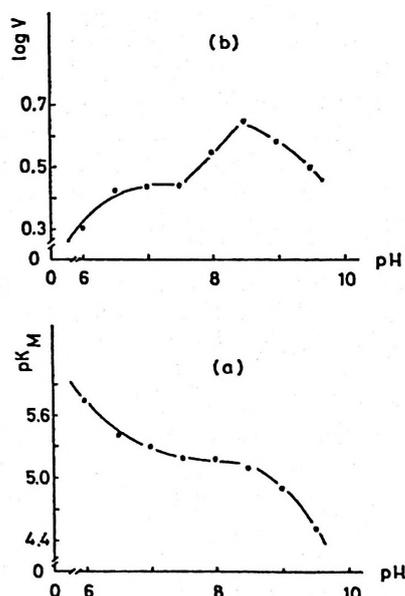


Fig. 4. Variación del  $pK_M$  y del  $\log V$  con el pH; sistema xantindeshidrogenasa- $O_2$ . (a)  $\log V$ ; (b)  $pK_M$ . La cubeta de reacción contiene: 0,32 U/ml de xantindeshidrogenasa.  $[Xantina] \mu M^{-1} = 100, 80, 60, 50, 25, 10$  y 5. Tampón tris-fosfatos 50 mM.

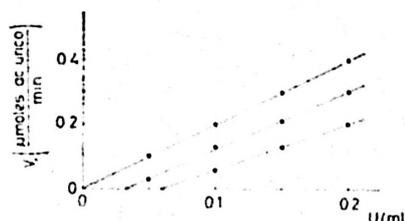


Fig. 5. Inhibición irreversible de la xantinoxidasa por pCMB.

La cubeta de reacción contiene: [xantina]  $\mu\text{M}^{-1} = 100$ ; de abajo a arriba: [pCMB]  $\mu\text{M}^{-1} = 5, 3$  y  $0$ . Tampón fosfatos  $50 \text{ mM}$  de pH  $8,0$ .

que muestra la curva que corresponde a la representación de  $\log V$  frente al pH (fig. 3b); en esta representación aparece un máximo a pH  $8,4$  que es el que corresponde al que se alcanza la velocidad máxima.

Los perfiles de las curvas de  $pK_M$  y  $\log V$  frente al pH obtenidos con la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo y con oxígeno como aceptor electrónico, muestran puntos de inflexión idénticos (figs. 4a y 4b); se observa, también, un máximo de velocidad a pH  $8,4$  (fig. 4b), tal como ocurría al emplear el  $\text{NAD}^+$  (figura 3b).

Al comparar las curvas de  $pK_M$  de la xantina con el  $\text{NAD}^+$  como aceptor electrónico (fig. 3c), o con el oxígeno (fig. 4a), se observan puntos de inflexión análogos, aunque la diferencia en los perfiles de ambas curvas sugiere que la afinidad de la xantina por el enzima varía cuando cambia el aceptor electrónico.

**Acción de los reactivos de grupos  $-SH$  sobre la xantinoxidasa de hígado de buey.** El pCMB\* ( $10 \mu\text{M}$ ) inhibe un  $86\%$  a la xantinoxidasa de hígado de buey ( $0,1 \text{ U/ml}$ ) con xantina ( $0,2 \text{ mM}$ ) como sustrato a pH  $8,0$  (fosfato sódico  $50 \text{ mM}$ ).

\* PCMB: p-cloromercuribenzoato.

La magnitud de las inhibiciones es independiente del tiempo de contacto entre el enzima y el reactivo (hasta  $220 \text{ min}$ ). La inhibición que aparece como irreversible (fig. 5) se anula, sin embargo, por diálisis de las muestras frente al mismo tampón ( $20 \text{ horas}$  a  $4^\circ \text{ C}$ ). El 2-mercaptoetanol ( $10 \text{ mM}$ ) no afecta a la actividad del enzima y la adición previa de este reactivo ( $1 \text{ mM}$ ) anula la inhibición que produce el pCMB. La xantinoxidasa de hígado de buey ( $0,2 \text{ U/ml}$ ) preincubada ( $30 \text{ min}$ ) con pCMB ( $10 \mu\text{M}$ ) recupera toda su actividad por adición del 2-mercaptoetanol ( $1 \text{ mM}$ ).

La *N*-etilmaleimida y la iodoacetamida son inhibidores reversibles de la xantinoxidasa de hígado de buey (figs. 6a y 6b). La primera produce una inhibición de tipo competitivo respecto a la xantina (fig. 7a) mientras que la que produce la

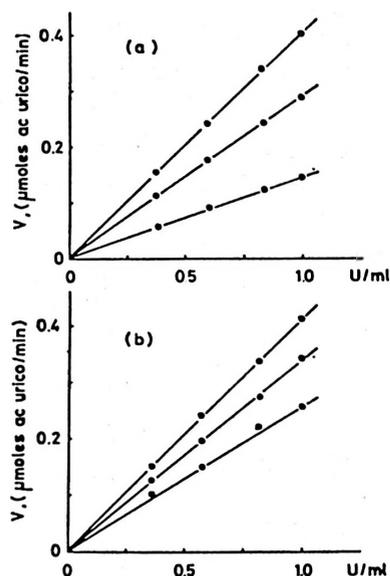


Fig. 6. Inhibición reversible de la xantinoxidasa por *N*-etilmaleimida y por iodoacetamida. La cubeta de reacción contiene [xantina]  $\mu\text{M}^{-1} = 100$ ; de abajo a arriba: (a) [*N*-etilmaleimida]  $\mu\text{M}^{-1} = 20, 10$  y  $0$ ; (b) [iodoacetamida]  $\mu\text{M}^{-1} = 1000, 100$  y  $0$ . Tampón fosfato sódico  $50 \text{ mM}$  de pH  $8,0$ .

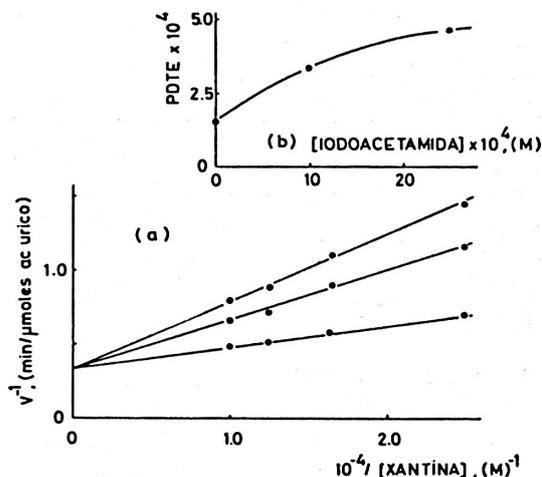


Fig. 7. Inhibición de la xantinoxidasa por la *N*-etilmaleimida.

La cubeta de reacción contiene: 0,2 U/ml de xantinoxidasa; tampón de fosfato sódico 50 mM de pH 8,0; (a) de abajo a arriba [N-etilmaleimida]  $\mu\text{M}^{-1} = 0, 10$  y 25; (b) representación secundaria de la figura 7 (a).

iodoacetamida es acompetitiva (fig. 7c). Las representaciones secundarias de ambas inhibiciones son hiperbólicas (figuras 7b y 8b). El intervalo de contacto (hasta 120 min) entre el enzima y el inhibidor no afecta a la magnitud de la inhibición.

El DTNB\* (hasta 0,3 mM) aun mantenido en contacto previo con el enzima (1 hora) no afecta a su actividad.

*Acción de los reactivos de los grupos —SH sobre la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo.* La actividad de la xantindeshidrogenasa (0,16 y 0,32 U/ml) frente al oxígeno o al  $\text{NAD}^+$  (1 mM) en condiciones aerobias, se inhibe totalmente por el pCMB (0,1 mM); el fenómeno no depende del intervalo de contacto (hasta 220 min) entre el enzima y el inhibidor. La inhibición por el pCMB (hasta 10  $\mu\text{M}$ )

\* DTNB: 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico).

es irreversible, independientemente de que el  $\text{NAD}^+$  (1 mM) o el oxígeno sea el aceptor electrónico, y se nula por diálisis de las muestras, de la composición mencionada, frente a tampón de fosfato sódico 50 mM de pH 8,0 (20 horas a 4° C). Por otra parte, la presencia del 2-mercaptoetanol (1 mM) anula la inhibición ejercida por el pCMB, aun en presencia del  $\text{NAD}^+$ .

Por su parte, tanto la *N*-etilmaleimida como la iodoacetamida son inhibidores reversibles de la actividad de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo cuando el oxígeno es el aceptor electrónico y el carácter de las inhibiciones es el mismo que el que ejercen sobre la xantinoxidasa de hígado de buey, esto es, competitivo y acompetitivo con respecto a la xantina para la *N*-etilmaleimida y la iodoacetamida, respectivamente. Sin embargo, ni la *N*-etilmaleimida ni la iodoacetamida inhiben a la xantinoxidasa cuando el  $\text{NAD}^+$  es el aceptor electrónico, en condiciones aerobias.

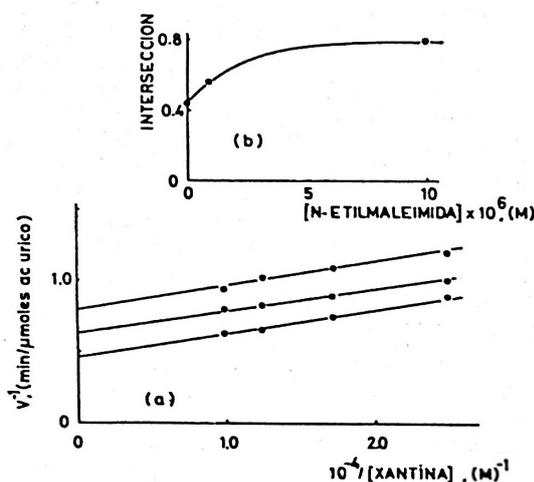


Fig. 8. Inhibición de la xantinoxidasa por iodoacetamida.

La cubeta de reacción contiene: 0,2 U/ml de xantinoxidasa; tampón de fosfato sódico 50 mM pH 8,0; (a) de abajo a arriba [iodoacetamida]  $\mu\text{M}^{-1} = 0, 100$  y 1000; (b) representación secundaria de la figura 8 (a).

El DTNB (0,1 mM) no afecta a la actividad del enzima cuando ésta utiliza el oxígeno o el  $\text{NAD}^+$  como aceptores electrónicos.

*Inducción de actividad con  $\text{NAD}^+$  en la xantinoxidasa de hígado de buey.* La xantinoxidasa de hígado de buey carece de la capacidad para utilizar al  $\text{NAD}^+$  como aceptor electrónico. Ha sido posible inducir dicha capacidad al someter a la xantinoxidasa (8 U/ml) a la acción del ditiotreitól, o de su isómero el ditiotritol (0,15 M) en un medio tamponado con fosfato sódico 50 mM de pH 8,0, durante diversos intervalos de tiempo (hasta 150 min). El enzima así tratado se muestra capaz de utilizar el  $\text{NAD}^+$  como aceptor electrónico (actividad tipo D), sin que desaparezca su capacidad de emplear al oxígeno como aceptor electrónico (actividad tipo O) (tabla II).

Tabla II. Efecto del tiempo de contacto entre la xantinoxidasa y el ditiotreitól.

En la célula de reacción se vertieron 0,75 ml de la mezcla en incubación (8 U/ml de xantinoxidasa incubada a 30°C con ditiotreitól 0,15 M en fosfato sódico 50 mM de pH 8,0) y se completó el volumen hasta 3 ml mediante la adición de los sustratos en fosfato sódico 50 mM, pH 8,0. La actividad tipo O y la actividad total representan los  $\mu\text{moles}$  de ácido úrico formados/min con xantina 0,1 mM y xantina 0,1 mM más  $\text{NAD}^+$  1 mM, respectivamente. La actividad tipo D representa los  $\mu\text{moles}$  de NADH formados/min con xantina 0,1 mM y  $\text{NAD}^+$  1 mM.

Tiempo de contacto (min)	Actividad			D/O
	Tipo O	Total	Tipo D	
0	1,8	1,2	0,8	0,44
15	1,7	1,4	1,0	0,59
30	1,7	1,7	1,2	0,71
45	1,5	1,8	1,35	0,90
60	1,4	1,8	1,5	1,07
75	1,35	1,9	1,6	1,18
90	1,25	1,85	1,65	1,24
105	1,25	2,0	1,8	1,44
120	1,0	2,0	1,9	1,9
150	1,0	2,0	1,9	1,9

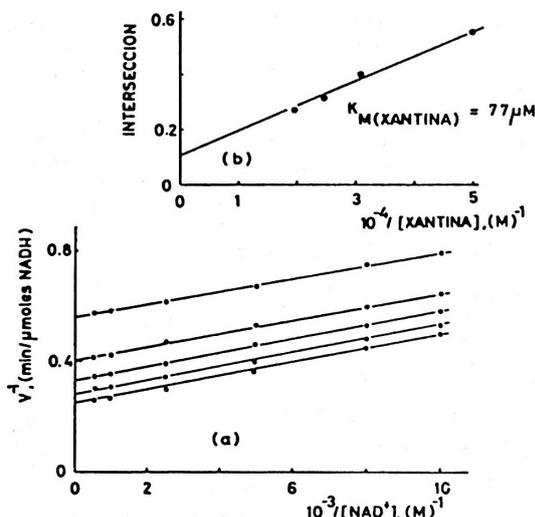


Fig. 9. Cinética de la actividad inducida por el ditiotreitól sobre la xantinoxidasa.

(a) Representación de Lineweaver-Burk correspondiente al  $\text{NAD}^+$ , del sistema xantina- $\text{NAD}^+$ -xantinoxidasa. (b) Representación de Vestling-Florini secundaria de la figura 9 (a). La disolución de xantinoxidasa contiene 0,8 U por ml y es 0,15 M en DTT, en tampón fosfato 50 mM, de pH 8,0. Se mantiene el contacto entre el enzima y el ditiotreitól 30 min a 30°C; 0,75 ml de la disolución se vierten en la cubeta de reacción, que contiene los sustratos, completando 3 ml.

El efecto inductor del ditiotreitól sobre la actividad tipo D es máximo cuando la concentración del reactivo está comprendida entre 0,15 y 0,175 M a 30°C de temperatura. Al incubar xantinoxidasa de hígado de buey (8 U/ml) con ditiotreitól (0,15 m) a distintas temperaturas, el máximo de actividad tipo D aparece a 55°C (tabla II).

Por otra parte, el 2-mercaptoetanol (20 mM), a pH 8,0 en un medio de tampón de fosfato sódico 50 mM, no induce actividad de tipo D incubado con el enzima (8 U/ml) a 30°C durante diversos intervalos de tiempo (hasta 60 min) (tabla II).

La relación de actividades deshidrogenasa/oxidasa (D/O), después de la acción

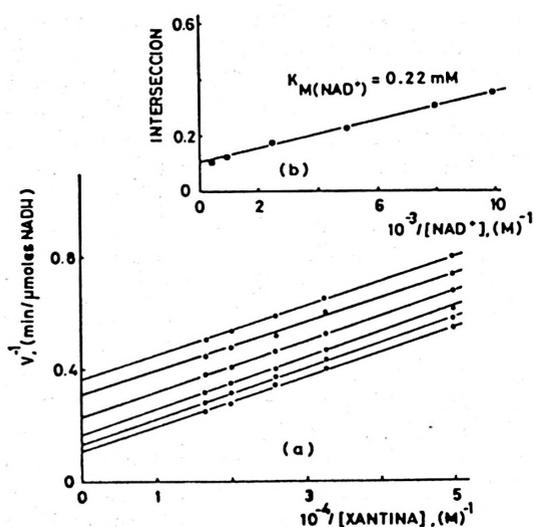


Fig. 10. Cinética de la actividad inducida por el ditioneitol sobre la xantinoxidasa. (a) Representación de Lineweaver-Burk correspondiente a la xantina, del sistema xantina-NAD $^+$ -xantinoxidasa; (b) representación de Vestling-Florini secundaria de la figura 10 (a). Condiciones de trabajo igual que las de la figura 9.

del ditioneitol, en las condiciones citadas, se mantiene constante aunque el enzima se dialice (48 horas) frente al mismo tampón en que se han efectuado las incubaciones. En efecto, de una relación deshidrogenasa/oxidasa (D/O) de 0,53 (enzima sin dializar), se llega a otra de 0,50 (enzima dializado).

Por otra parte, se han obtenido los valores de los parámetros cinéticos reales  $K_M$  y  $V$  (figs. 9 y 10) para el enzima al que se le ha inducido actividad de tipo D. Como puede observarse, tanto para la representación de Lineweaver-Burk correspondiente a la xantina, como en la que se refiere al NAD $^+$ , se obtienen rectas paralelas (figs. 9a y 10a). Asimismo, se pretendió disminuir el valor de la relación deshidrogenasa/oxidasa en la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo, tal como se había efectuado con la xantindeshidrogenasa de hígado de rata (1, 5,

6, 7, 8, 16, 17, 18). El tratamiento de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo con proteasas (tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina y subtilisina) no provoca ningún incremento en su capacidad para emplear el oxígeno como aceptor electrónico o descenso de la actividad con NAD $^+$ .

### Discusión

De la observación de las curvas de  $pK_M$  y  $\log V$  frente al pH que corresponden a la actuación de la xantinoxidasa de hígado de buey, en condiciones areobias, sobre la xantina e hipoxantina como sustratos, con el oxígeno como aceptor electrónico y de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo sobre la xantina como sustrato, ya sea con oxígeno o con NAD $^+$ , en condiciones aerobias, como aceptores electrónicos, se puede deducir la existencia de tres grupos ionizables análogos en las moléculas de ambos enzimas. El que aparezcan en las representaciones de  $pK_M$  y de  $\log V$ , frente al pH, sugiere que deben hallarse implicados en la formación del complejo enzima-sustrato y en la etapa limitante de la velocidad de reacción.

El distinto perfil de las curvas de  $pK_M$  (xantina) y  $\log V$  obtenidos con la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo en presencia de NAD $^+$ , con respecto a las mismas representaciones en ausencia de éste, sugieren que la presencia del aceptor provoca una variación en la afinidad de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo por el sustrato reducido, lo que indicaría que el enzima y el coenzima experimentan algún tipo de interacción con anterioridad a la fijación del sustrato purínico y su correspondiente oxidación.

Por otra parte, al considerar la inhibición de la xantinoxidasa de hígado de buey y la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo por los reactivos de los grupos SH, pCMB, DTNB, N-etilmaleimida y iodoacetamida, se observa que los dos últimos sólo inhiben a la xantindeshidro-

genasa de hígado de pollo en ausencia de  $\text{NAD}^+$ .

La inhibición irreversible por pCMB puede anularse por diálisis prolongada de la mezcla enzima-inhibidor, o por tratamiento con 2-mercaptoetanol, todo ello sugiere una estabilidad limitada del correspondiente complejo enzima-pCMB.

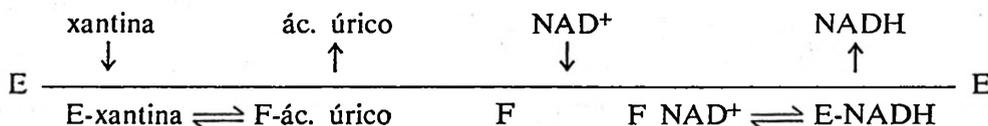
Por otra parte, el hecho de que el DTNB no ejerza ningún tipo de acción sobre la actividad de la xantinoxidasa de hígado de buey ni sobre la de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo indica que el reactivo no bloquea ningún grupo —SH esencial para la actividad catalítica, quizá debido al gran tamaño de la molécula del reactivo.

La inhibición de tipo competitivo con respecto a la xantina que la N-etilmaleimida ejerce sobre la xantinoxidasa de hígado de buey y sobre la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo, indica que el inhibidor se fija en el mismo centro activo al que se une la xantina. Al ser la inhibición de tipo hiperbólico es necesario suponer que el complejo enzima-N-etilmaleimida es capaz de catalizar la oxidación de la xantina a ácido úrico; esta hipótesis se puede explicar si se acepta que la molécula de sustrato y la de inhibidor se unen cada una a uno cualquiera de los centros activos de las dos hemimoléculas idénticas, que se ha postulado que poseen los enzimas considerados (2, 17, 18). En estas condiciones la

unión de la molécula del inhibidor no impedirá la actividad catalítica del centro activo que queda libre, si bien la velocidad global de catálisis disminuirá de forma hiperbólica.

El carácter acompetitivo de la inhibición, con respecto a la xantina, que ejerce la iodoacetamida sobre la xantinoxidasa de hígado de buey y sobre la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo, cuando el oxígeno es el aceptor electrónico, se puede interpretar a través de su unión con otro centro, posiblemente al que se une habitualmente el  $\text{NAD}^+$ , pero se precisa que en la combinación entre la xantina y el enzima y la de éste con el inhibidor exista una etapa cinéticamente irreversible; puede considerarse como tal la liberación del ácido úrico. Por otra parte, el carácter hiperbólico de la inhibición puede explicarse de forma análoga a la que se indica para la N-etilmaleimida.

La xantindeshidrogenasa de hígado de pollo no es inhibida por la N-etilmaleimida y, por la iodoacetamida en presencia de  $\text{NAD}^+$  (en aerobiosis). Por otra parte, las curvas de  $\text{pK}_M(xantina)$  del enzima en presencia o ausencia de  $\text{NAD}^+$  son diferentes. Sugieren los hechos que el  $\text{NAD}^+$  debe interaccionar con el enzima con anterioridad a que lo haga la xantina y como el mecanismo al que adaptan su comportamiento las xantindeshidrogenasas es de tipo *ping-pong*, la secuencia de reacción debe ser:



El comportamiento del sistema en presencia de  $\text{NAD}^+$  deberá cumplir las condiciones de mecanismo *ping-pong*, pero a su vez el  $\text{NAD}^+$  deberá interaccionar con el enzima con anterioridad a que lo haga la xantina. Explicaría estos resultados la hipótesis de que el  $\text{NAD}^+$  se une

a la forma E del enzima además de unirse a la forma F como aceptor electrónico. Al actuar como modulador de la actividad (unión a la forma E) se liberaría intransformado en alguna de las etapas del mecanismo de reacción. Dicha hipótesis concordaría con los resultados obte-

nidos por otros autores (3, 13, 14, 15) que observan curvaturas en las representaciones de Lineweaver-Burk, correspondientes a la xantina, al trabajar con xantindeshidrogenasa de hígado de pollo, por lo que sugieren que dicho mecanismo no sea de tipo *ping-pong* puro.

La inducción de actividad con  $\text{NAD}^+$  en la xantinoxidasa de hígado de buey, mediante el tratamiento con reductores tales como el ditiotreititol y el ditioeritritol, sugiere que la adquisición de dicha capacidad viene dada por una reducción en la molécula enzimática provocada por dicho reactivo. Ello daría lugar a la aparición de un nuevo centro activo capaz de enlazar al  $\text{NAD}^+$ , o bien modificaría uno ya existente de tal forma que fuese útil para transportar el flujo electrónico, esto es, efectuar la reducción del  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ . La hipótesis puede estar de acuerdo con la aparición de ciertos grupos SH provocada por reducción de grupos  $-\text{S}-\text{S}-$  en la molécula de algunas deshidrogenasas, lo que ha sido postulado por algunos autores para la xantindeshidrogenasa de hígado de rata (17, 18).

El hecho de que el enzima tratado con ditiotreititol muestre rectas paralelas en las representaciones de Lineweaver-Burk, constituye un indicio de análogo comportamiento con los enzimas que en su estado nativo son capaces de utilizar al  $\text{NAD}^+$  como aceptor electrónico, lo que sugiere que también en este caso el mecanismo sea de tipo *ping-pong* (13, 15). Si bien con ciertas anomalías, como se ha indicado para la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo en el presente trabajo. Se puede concluir, a partir de la comparación de las distintas propiedades estudiadas en la xantinoxidasa de hígado de buey y en la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo, que ambos enzimas exhiben análogo comportamiento cuando el aceptor electrónico que utilizan es el oxígeno; sin embargo, la presencia del  $\text{NAD}^+$  altera el comportamiento de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo frente

a la xantina (cambio del perfil de la curva de  $\text{pK}_M$  (xantina) frente al pH y anula la inhibición ejercida por la N-etilmaleimida y por la iodoacetamida).

Por otra parte, se puede formular la hipótesis de que ambos enzimas son muy análogos, diferenciándose fundamentalmente en algunos grupos disulfuro, que pueden encontrarse como tales en la xantinoxidasa de hígado de buey o bien en su forma reducida de  $-\text{SH}$  en la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo, hecho que concordaría con la aparición de actividad con el  $\text{NAD}^+$  al tratarla con ditiotreititol o ditioeritritol.

### Resumen

Se describe un método de purificación de xantinoxidasa de hígado de buey que permite obtener preparados cuya actividad específica es 256 veces superior a la del homogeneizado inicial.

La xantinoxidasa de hígado de buey y la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo, con el oxígeno aceptor electrónico, exhiben curvas de  $\text{pK}_M$  y  $\log V$ , frente al pH, de perfil similar. El perfil de la curva de  $\text{pK}_M$  (xantina) de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo es distinto cuando el  $\text{NAD}^+$  es el aceptor electrónico (condiciones aerobias). Sin embargo, en todas las curvas aparecen tres puntos de inflexión para los mismos valores de pH.

Los dos enzimas son inhibidos irreversiblemente por el pCMB y de forma reversible por la N-etilmaleimida y por la iodoacetamida, siendo el carácter de dichas inhibiciones competitivo y acompetitivo, respectivamente. Estos hechos sugieren que el  $\text{NAD}^+$  modifica la actuación del enzima al unirse a él antes de que lo haga la xantina, sin que el  $\text{NAD}^+$  sufra transformación alguna en este lugar de unión.

La xantinoxidasa de hígado de buey tratada con ditiotreititol (o bien con ditioeritritol) 0,15 M adquiere actividad permanente con el  $\text{NAD}^+$ , sin que por ello desaparezca su actividad con el oxígeno. El enzima así tratado exhibe cinética de rectas paralelas.

### Bibliografía

1. BATELLI, M. G., DELLA CORTE, E. and STIRPE, F.: *Biochem. J.*, 126, 747-749, 1972.

2. BRAY, R. C.: En «The Enzymes» (3.<sup>a</sup> ed.), Vol. 12 (P. D. Boyer, ed.), Academic Press, Nueva York, 1975, págs. 314-317.
3. BRAY, R. C.: En «The Enzymes» (3.<sup>a</sup> ed.), Vol. 12 (P. D. Boyer, ed.), Academic Press, Nueva York, 1975, págs. 365-369.
4. BRAY, R. C.: En «The Enzymes» (3.<sup>a</sup> ed.), Vol. 12 (P. D. Boyer, ed.), Academic Press, Nueva York, 1975, pág. 398.
5. DELLA CORTE, E.: and STIRPE, F.: *Biochem. J.*, **108**, 349-351, 1968.
6. DELLA CORTE, E.: *FEBS Letters*, **2**, 83-84, 1968.
7. DELLA CORTE, E., GOZZETI, G., NOVELLO, F. and STIRPE, F.: *Biochem. Biophys. Acta*, **191**, 164-166, 1969.
8. DELLA CORTE, E. and STIRPE, F.: *Biochem. J.*, **126**, 739-745, 1972.
9. DIXON, M.: *Biochem. J.*, **55**, 161-171, 1953.
10. DIXON, M. and WEBB, C. E.: «Enzymes» (2.<sup>a</sup> ed.), Longmans Green, Londres, págs. 315-359.
11. GUBERT, S. and BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **28**, 213-224, 1972.
12. KRENITSKY, T. A.: *Adv. Exp. Med. Biol.*, **41 A**, 51-64, 1972.
13. MASSEY, V., BRUMBY, P. E., KOMAI, H. and PALMER, G.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 1682-1691, 1969.
14. PRIEST, D. G. and FISCHER, J. R.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **146**, 391-399, 1971.
15. RAJAGOPALAN, K. V. and DELLA CORTE, E.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 4097-4107, 1967.
16. STIRPE, F. and DELLA CORTE, E.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855-3863, 1969.
17. WAUD, W. R. and RAJAGOPALAN, K. V.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **172**, 354-364, 1976.
18. WAUD, W. R. and RAJAGOPALAN, K. V.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **172**, 365-379, 1976.