

V. XANTINA OXIDASA-XANTINA DEHIDROGENASA: E.C. 1.2.3.2 EXPERIENCIAS HEPATICAS CON UN COLORANTE SINTETICO Y CON SUSTRATOS NATURALES

Dr. Héctor Alfredo Molina, Doctor en Bioquímica - Profesor Titular Efectivo.
Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

RESUMEN

El presente trabajo sobre la XOD (xantina oxidasa dehidrogenasa) hepática se ha realizado *in vitro* con homogenatos de hígado de rata. La incubación anaerobia de homogenatos de hígado transforma a las bases adenina y guanina en hipoxantina y xantina, respectivamente, sin que haya formación de ácido úrico. Si la incubación es en condiciones aerobias, la XOD forma una cantidad de ácido úrico molarmente equivalente a la suma de hipoxantina y xantina, presentes originalmente en el homogenato. La incubación aerobia de un homogenato en presencia de xantina adicionada como sustrato, provoca sólo un ligero aumento de la producción de ácido úrico; sin embargo, si previamente se adiciona T.T.C., se produce ácido úrico en elevada cantidad. La adición de hipoxantina en un ensayo similar se traduce en la formación de xantina como único producto de la reacción; sin embargo, en presencia de T.T.C. dicha base se transforma cuantitativamente en ácido úrico. Finalmente los valores de K_m en presencia y ausencia de T.T.C. son del orden de $2,8 \times 10^{-5}$ M.

SUMMARY

The present study on hepatic XOD (Xanthine oxidase dehydrogenase) was carried out *in vitro* with rat liver homogenates. Anaerobic incubation of liver homogenates induced the transformation of the bases adenine and guanine present, into the corresponding hypoxanthine and xanthine, but uric acid is not formed. When the incubation is carried out in aerobic conditions, XOD then induces the production of a quantity of uric acid molarly corresponding to the sum of hypoxanthine plus xanthine, which would otherwise accumulate in an anaerobic experiment. If xanthine, as a substrate, is added to an aerobic incubation of an homogenate, only a slight increase in its normal uric acid production is observed; however, when the T.T.C. has also previously been added to the mixture, uric acid is then produced in substantial quantities, the dye acting as an effective electron carrier. Added hypoxanthine, also acts as a substrate of XOD, the base being converted into xanthine in aerobic conditions and quantitatively into uric acid when T.T.C. is also present. Finally, K_m value is practically of the same order, $K_m = 2.8 \times 10^{-5}$ M, whether established in the presence or in the absence of T.T.C.

INTRODUCCION

Considerando la importancia que tiene esta enzima en el metabolismo de las nucleoproteínas, así como en el dismetabolismo purínico que puede dar origen a la Gota,⁽¹⁾ y teniendo en cuenta que todavía se discute el mecanismo íntimo de acción enzimática,⁽²⁾ nos propusimos investigar a la XOD utilizando *in vitro* homogenatos de hígado de rata que sabemos contienen elevada actividad de XOD en su parénquima y por la fácil asequebilidad del animal. Como estos homogenatos tienen una gran capacidad de reducir y oxidar sustratos purínicos y especialmente convertir la xantina en ácido úrico, se realizaron experiencias con xantina e hipoxantina (sustratos naturales), en medio anaeróbico y aeróbico y en presencia de un colorante sintético, en nuestro ensayo el cloruro de trifeniltetrazolium (T.T.C.).

Además se trató de aclarar algunas características de la XOD hepática y se estableció la constante de Michaelis (K_m) para la XOD.

MATERIAL Y METODOS

a) Sustratos y enzimas

El ácido úrico, la xantina y la hipoxantina fueron de calidad Sigma (Grado I). Las disoluciones patrones de xantina e hipoxantina se preparan disolviendo cantidades molares en pequeños volúmenes de HON a 0,5 M, calentando suavemente a baño María y enrasando a volumen deseado, ajustando el pH conveniente. El ácido úrico se disuelve en agua bidestilada hirviendo que contenga la mitad en peso de carbonato de litio. El cloruro de trifeniltetrazolium (T.T.C.) es de calidad Merck y es colorante sintético de oxidorreducción.

La enzima XOD y la uricasa se preparan en nuestro Laboratorio y contienen 3 U/ml. El agua usada es

bidestilada, y el resto de los fármacos accesorios: fosfatos, boratos, etc., son de calidad Merck.

b) Preparación de homogenatos

Se utilizan hígados de ratas recién sacrificadas y se conservan al estado de congelación, si no se ensayan antes de 2 horas. La elevada actividad de la XOD hepática en presencia del colorante sintético varía de un animal a otro, siendo término medio de 1 micromol de ácido úrico por minuto por gramo de hígado fresco a 30° C, o sea 1 U/g de órgano fresco, actividad que es superior al hígado humano e inferior al hígado de aves.⁽³⁾

Para el homogenato se usa un homogeneizador tipo Virtis, licuándose una cantidad exactamente pesada de hígado con tampón de fosfatos 0,05 M, pH 7,4 en relación 1:5 (P/V), tratando de hacer las operaciones a una temperatura que no supere los 8° C, evitando sobrecalentamiento. La conservación en frío es relativa, por lo que los homogenatos deben ser utilizados dentro del mismo día.

c) Determinación de la actividad de la XOD

Diluido el homogenato con tampón de fosfato entre 1:20 hasta 1:500 se consiguen actividades adecuadas según se adicionen o no sustratos y colorante; se procede a incubar en tubos de 50 ml atravesados en el tapón por 2 tubos para la introducción y salida de aire. El tubo en que penetra el aire llega al fondo del recipiente, con lo que el burbujeo asegura la homogeneidad y la agitación de la mezcla. Los tubos se mantienen sumergidos en un baño María a 30° C durante la incubación.

Para determinar la actividad se mezclan 5 ml de homogenato diluido con 5 ml de xantina, 2×10^{-4} M, 0,5 ml de T.T.C., 0,01 M y 5,5 ml de tampón de fosfatos, pH 7,4.

Se hace burbujear aire y se extraen muestras de 3 ml a los 0, 5, 10, 15 y 20 minutos de incubación. No se debe alterar el volumen final de la mezcla, ajustándolo según se use o no sustrato o T.T.C.

Se desproteinizan los 3 ml de la muestra con 1 ml de HClO_4 al 5 %, deteniéndose la actividad enzimática. Se centrifuga y en sobrenadante se determina el ácido úrico por el método de Trinder.⁽⁴⁾ Mediante la curva de tiempos vs. DO se calcula gráficamente (tangente en el origen), la velocidad inicial de la reacción.

d) Determinación de bases púricas (Kalckar modificado)⁽⁵⁾

Este método se basa en el empleo adecuado de la XOD y uricasa, midiendo los cambios de DO que tienen lugar cuando dichas enzimas actúan en procesos redox de la hipoxantina, xantina y ácido úrico, en nuestro caso presentes en el sobrenadante. Previamente hay que proceder a situar la posición de los máximos de absorción de cada una de las tres purinas, independientemente, así como establecer sus respectivos coeficientes de absorción específica. Para ello se trabajó a pH 7,5, porque únicamente a este pH se consigue que los 2 puntos isosbísticos A y B estén en sensible coincidencia con las longitudes de onda de máxima absorción de cada una de las 3 purinas y en especial de la hipoxantina y xantina (figura 1).

$$\begin{aligned} \text{Hipoxantina} &= 10,5 \times 10^3 \\ \text{A. úrico} &= 12,4 \times 10^3 \\ \text{Xantina} &= 8,7 \times 10^3 \end{aligned}$$

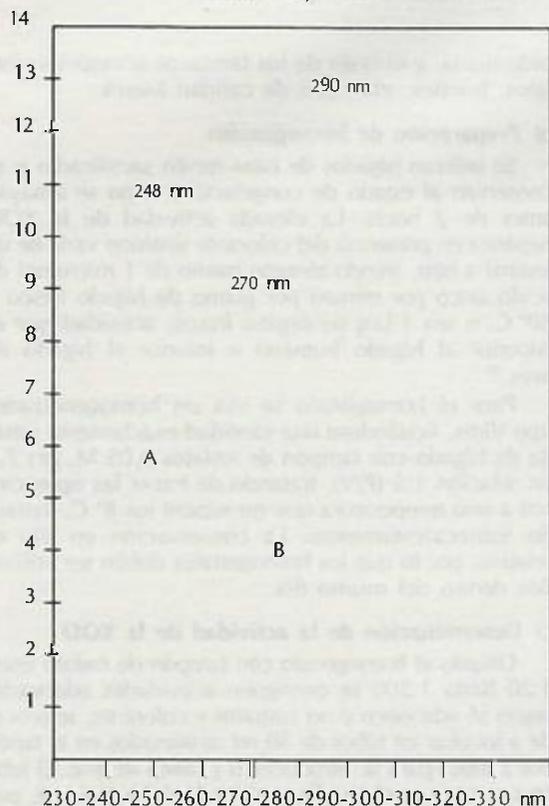


Figura 1. Curvas de absorción de las purinas a pH 7,5.

Observando esta figura se comprende cómo trabajando a 248 nm (punto A), en el que la xantina y el ácido úrico poseen idénticos coeficientes de extin-

ción, se puede establecer la cantidad de hipoxantina presente en la solución, midiendo la diferencia de DO del líquido problema antes y después de haber dejado actuar la XOD en condiciones estándar para producir la desaparición total de la base púrica. Análogamente trabajando con la longitud de onda del punto B, 270 nm en el que el ácido úrico y la hipoxantina poseen igual coeficiente de extinción, se consigue determinar la proporción de xantina presente por diferencia en el cambio de DO del líquido experimentado con XOD.

En experimento aparte se deja actuar la uricasa a pH 8,5 y se mide la diferencia de DO a 290 nm antes y después de la actuación de la enzima, lo que constituye una medida del ácido úrico presente. La cantidad de ácido úrico formado por la XOD debe corresponder equimolecularmente a la suma de las cantidades de xantina + hipoxantina, originalmente presentes, lo que constituye una comprobación del método analítico.

RESULTADOS

Cuando se incubaba un homogenato de hígado de rata en medio aerobio se observa con el tiempo una determinada producción de ácido úrico a costa de la xantina presente y de las nuevas cantidades de bases formadas durante la incubación. La XOD presente actúa con los colaboradores de transporte electrónico "naturales" del hepatocito provocando la deshidrogenación de la xantina. La producción de ácido úrico es limitada y desde luego menor que cuando se adiciona xantina al homogenato y sobre todo si se usa T.T.C. Pero si la incubación se realiza en medio anaerobio, la XOD no actúa produciendo ácido úrico, y en cambio se observa una acumulación de xantina e hipoxantina en el incubado, siendo acompañada con la desaparición de adenina y guanina originalmente presentes. Las cantidades de xantina + hipoxantina después de la incubación corresponden también equimolecularmente a la de ácido úrico que se produce cuando la incubación se hace burbujear aire por la mezcla.

Esto concuerda perfectamente con la ecuación:

$$\begin{aligned} \text{adenina} + \text{adenasa} &= \text{hipoxantina} \\ \text{guanina} + \text{guanasa} &= \text{xantina} \end{aligned}$$

Bases que cuando la aerobiosis es suficiente se transforman por la XOD en ácido úrico. Todas estas degradaciones se siguen por el método tradicional de Kalckar (modificado) y nos permite determinar los porcentajes de hipoxantina, xantina y ácido úrico presentes en mezclas heterogéneas (tablas I y II).

Se observa que la incubación aerobia durante 2 horas de un homogenato hepático, adicionado de hipoxantina, pero sin T.T.C., apenas provoca aumento en la producción normal de ácido úrico, mientras que se forman cantidades significativas de xantina a expensas de hipoxantina que va desapareciendo. Es preciso adicionar colorante al medio para conseguir que toda la xantina recién formada y la hipoxantina no metabolizada se transformen cuantitativamente en ácido úrico. Esta conversión total de hipoxantina en ácido úrico vía xantina se observa también cuando la incubación del homogenato sin colorante se prolonga por más tiempo (4 horas). Parece, luego, que el homogenato posee insuficiente cantidad de transportadores electrónicos naturales para conseguir que la transformación final de toda la hipoxantina agregada en ácido úrico, tenga lugar en un lapso limitado (tabla III).

TABLA I

Resultados comparativos en la incubación aerobia de un homogenato hepático de rata durante 2 hs. sin xantina adicionada o con ella, en ausencia o presencia de T.T.C.
Concentración del homogenato: 62,5 mg hígado/ml

| Ensayo | Hipoxantina μ Mg hígado | | | Xantina μ Mg hígado | | | Acido úrico μ Mg hígado | | |
|---|--------------------------------|-------|----------|----------------------------|-------|----------|--------------------------------|-------|----------|
| | Tiempo 0 | 2 hs. | Δ | Tiempo 0 | 2 hs. | Δ | Tiempo 0 | 2 hs. | Δ |
| Sin xantina Sin T.T.C. | 0,2 | 0,0 | -0,2 | 0,3 | 0,0 | -0,3 | 2,2 | 8,3 | 6,1 |
| Sin xantina Con T.T.C. ($6,25 \times 10^{-4}$ M) | 0,2 | 0,0 | -0,2 | 0,3 | 0,0 | -0,3 | 2,2 | 8,8 | 6,6 |
| Con xantina (10 Mg hígado) Sin T.T.C. | 0,3 | 0,0 | -0,3 | 10,2 | 3,5 | -6,7 | 2,7 | 15,9 | 13,2 |
| Con xantina (10 Mg hígado) Con T.T.C. ($6,25 \times 10^{-4}$ M) | 0,3 | 0,0 | -0,3 | 10,2 | 0,0 | -10,2 | 2,6 | 19,5 | 16,7 |

TABLA II

Resultados comparativos en las incubaciones de un homogenato hepático en medio anaerobio y aerobio, sin adición alguna de sustrato o T.T.C.
Concentración del homogenato: 62,5 mg hígado/ml

| Ensayo | Hipoxantina μ Mg hígado | Xantina μ Mg hígado | Acido úrico μ M/ hígado |
|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Tiempo 0 | 0,1 | 3,5 | 2,1 |
| Incubación anaerobia (2 hs.) | 2,4 | 0,3 | 2,2 |
| Incubación aerobia (2 hs.) | 0,0 | 0,0 | 8,5 |

Actividad de la XOD en hepatocito

Para ello, se diluye el homogenato entre 1:200 a 1:500 y se incuba a 30° C junto con la xantina añadida en presencia de colorante y corriente de aire. El ácido úrico se determina, como vimos por Trinder, con el auxilio de una curva de calibración. Se construye la curva de ácido úrico vs. tiempos de incubación y se deduce gráficamente la velocidad inicial de la reacción.

El promedio obtenido de 30 ratas en presencia de colorante es de $1,5 \pm 0,3$ micromoles de ácido úrico por minuto y por gramo de hígado fresco (hígado humano: 0,04 micromoles).⁽⁶⁾

La única diferencia observada entre la acción seudoxidásica, sin colorante, y de XOD, con colorante adicionado, manifestada por los homogenatos, consiste en la distinta magnitud de las respectivas velocidades de reacción, la que es mayor en presencia del colorante. Nosotros determinamos el valor del Km para ambas reacciones y se obtuvieron valores aproximadamente iguales, lo que supone ser sólo una enzima. En el primer caso la enzima actúa con escaso porcentaje de metabolitos de transporte y en el segundo lo hace más eficazmente por el agregado del colorante (coenzima sintética). Para realizar estas determinaciones se midieron la velocidad inicial empleando 5 concentraciones progresivas de xantina, del orden de 0,25 a 4×10^{-5} M, y utilizando el método gráfico se establece la pendiente en el origen de las curvas de actividad, trazadas éstas con los incrementos de DO vs. tiempos de incubación de 2, 4, 6 y 8 minutos, a 30° C con homogenatos diluidos apropiadamente de tal forma que en las determinaciones sin colorante, las mezclas incubadas contengan aproximadamente 50 mg de hígado por mililitro y en los ensayos con colorantes la concentración fuera de 2 mg por mililitro. Los valores medios de 5 determinaciones fueron para un pool de homogenatos de hígados, los siguientes:

$K_m = 3 \times 10^{-5}$ M (seudoxidásica)

$K_m = 2,8 \times 10^{-5}$ M (deshidrogenásica)

Valores semejantes que condicionan una sola enzima con diferente eficacia frente a coenzimas naturales y sintéticas.

TABLA III

Resultados comparativos en la incubación aerobia de un homogenato hepático con hipoxantina adicionada en ausencia o presencia de T.T.C. ($6,25 \times 10^{-4}$)

Tiempo de incubación: 2 hs.

Concentración del homogenato: 62,5 mg/ml

Hipoxantina adicionada: 10 μ Mg hígado

| Ensayo | Hipoxantina μ Mg hígado | | | Xantina μ Mg hígado | | | Acido úrico μ Mg hígado | | |
|------------|--------------------------------|-------|----------|----------------------------|-------|----------|--------------------------------|-------|----------|
| | Tiempo 0 | 2 hs. | Δ | Tiempo 0 | 2 hs. | Δ | Tiempo 0 | 2 hs. | Δ |
| Sin T.T.C. | 11,1 | 4,3 | -6,8 | 0,3 | 6,4 | 6,1 | 2,1 | 9,6 | 7,5 |
| Con T.T.C. | 11,1 | 0,0 | -11,1 | 0,3 | 0,0 | -0,3 | 2,2 | 19,9 | 17,7 |

BIBLIOGRAFIA

1. Becker, M.; Seegmiller, J.: "Genetic aspects of Gout". *Ann. Rev. Med.*, 25:15-28, 1974.
2. Swan, J.; Bray, R.: "Multiple phases in the reduction of XOD". *Eur. J. Biochem.*, 26:407-417, 1965.
3. Molina, H.; Corvalán, M.: "Observaciones de actividad enzimática en niños de ambos sexos". *Acta Bioq. Clin. Latinoam.*, 4:351-358, 1978.
4. Trinder, P.: "Uric acid determination". *Ann. Clin. Biochem.*, 6:24-30, 1965.
5. Kackar, H.: "Differential spectrophotometric of purines by means of specific enzymes". *J. Biol. Chem.*, 167:429-450, 1947.
6. Corvalán, M.; Molina, H.: "Desnutrición: posibles parámetros que contribuyan a su mejor estudio". *Laboratorio (España)*, 74:445-452, 1982.