



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mecanismo cinético de la xantinoxidasa de hígado de buey y de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo

Enric I. Canela Campos

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

R. 15.499

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
 Facultad de Químicas
 Departamento de Bioquímica

MECANISMO CINETICO DE LA XANTINOXIDASA DE HIGADO DE BUEY Y DE LA XANTINDESHIDROGENASA DE HIGADO DE POLLO.

Memoria presentada por D. Enrique Esidro Canela Campos,
 para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Vº Bº
 EL DIRECTOR

EL DOCTORANDO

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700448624

El trabajo experimental descrito en la presente memoria ha sido efectuado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Químicas de la Universidad de Barcelona.

Al Profesor Doctor Don Jorge Bozal Fes, Director de esta Tesis, expreso mi agradecimiento por la orientación del trabajo y la discusión de los resultados. Le doy las gracias, también, por haberme iniciado en el camino de la investigación.

Asimismo, quiero agradecer a los profesores y compañeros del Departamento de Bioquímica, la ayuda con que me han asistido durante la realización del trabajo.

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
1 INTRODUCCION.....	1
1.1 GENERALIDADES.....	1
1.2 FUNCIONALIDAD ENZIMATICA.....	3
1.3 CENTRO CATALITICO DE LA XANTINOXIDASA Y TRANSFEREN CIA ELECTRONICA.....	6
1.4 INTERCONVERSION XANTINOXIDASA XANTINDESHIDROGENASA	13
1.5 OTRAS TRANSFORMACIONES CATALIZADAS POR LA XANTIN- OXIDASA Y LA XANTINDESHIDROGENASA.....	16
1.6 MECANISMOS DE REACCION.....	19
1.7 ACTIVACION DE LA XANTINOXIDASA.....	21
2 OBJETO DEL TRABAJO.....	24
3 MATERIALES Y METODOS.....	26
3.1 MATERIALES.....	26
3.1.1 PREPARADOS ENZIMATICOS.....	26
3.1.2 PREPARACION DE REACTIVOS.....	26
3.1.2.1 Sustratos.....	26
3.1.2.2 Cofactores.....	27
3.1.3 DISOLUCIONES TAMPON.....	28
3.1.3.1 Tampón tris-fosfato sódico.....	28
3.1.3.2 Tampón fosfato sódico.....	28
3.1.4 MATERIAL DE CROMATOGRAFIA.....	28
3.1.4.1 Resinas de intercambio iónico: DEAE-celulosa.....	28
3.1.4.2 Resinas de exclusión: Sephadex G-200.....	29
3.2 METODOS.....	30
3.2.1 DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS...	30
3.2.1.1 Determinación de actividad XO.....	30
3.2.1.2 Determinación de actividad XDH.....	32
3.2.1.3 Determinación de la actividad dia- forásica.....	33
3.2.1.4 Determinación de la actividad uri- cásica.....	33
3.2.1.5 Determinación de la actividad pro- teolítica.....	33

3.2.2	PURIFICACION DE LA XDH.D.....	33
3.2.3	DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEICO.....	34
3.2.3.1	Método espectrofotométrico.....	34
3.2.3.2	Método de Lowry.....	34
3.2.4	TECNICAS CROMATOGRAFICAS.....	36
3.2.5	DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE GRUPOS SULFHIIDRILLO CON PGMB	36
3.2.6	EXPRESION DE LOS PARAMETROS CINETICOS.....	38
3.2.6.1	Cálculo de los parámetros cinéticos	38
3.2.6.2	Determinación de las constantes ci néticas reales.....	39
3.2.6.3	Cinética de inhibición.....	39
3.2.6.4	Mecanismos cinéticos.....	43
3.2.6.5	Variación de los parámetros cinéti cos con el pH.....	43
3.2.6.6	Cinética de alosterismo.....	44
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	47
4.1	PURIFICACION DE LA XO.....	47
4.1.1	PREPARACION DE LOS HOMOGENEIZADOS.....	47
4.1.1.1	Proporción óptima hígado/sacarosa en los homogeneizados.....	48
4.1.1.2	Determinación de la proteína total en el hígado de buey.....	49
4.1.2	ELIMINACION DE MITOCONDRIAS PESADAS Y LIGE RAS.....	49
4.1.3	PRECIPITACION TERMICA DE LAS PROTEINAS TER MOLABILES.....	50
4.1.3.1	Coagulación del precipitado.....	51
4.1.4	FRACCIONAMIENTO SALINO DELLOS HOMOGENEIZADOS	52
4.1.4.1	Establecimiento del límite mínimo de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ necesario para precipi tar totalmente la XO.....	52
4.1.4.2	Precipitación con sulfato amónico al 65% de saturación.....	54
4.1.4.3	Estudio del límite de sulfato amó nico necesario para precipitar pro teínas acompañantes de la XO.....	54

	<u>Pág.</u>	
4.1.4.4	Reprecipitación de la XO con sulfato amónico.....	56
4.1.5	SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS.....	57
4.1.5.1	Cromatografía con DEAE-celulosa...	57
4.1.5.2	Cromatografía con Sephadex G-200..	58
4.1.6	PROCESO DE PURIFICACION.....	62
4.2	VARIACION DE K_M Y $V_{m\acute{a}x}$ CON EL pH DE LA XO Y DE LA XDH.....	67
4.2.1	VARIACION CON EL pH DE LOS VALORES DE K_M Y $V_{m\acute{a}x}$, EN LOS SISTEMAS CATALIZADOS POR LA XO	67
4.2.1.1	Variación con el pH de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ en el sistema hipoxantina-XO-xantina.....	67
4.2.1.2	Variación con el pH de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ en el sistema xantina-XO-ac.úrico	68
4.2.2	VARIACION CON EL pH DE LOS VALORES DE K_M Y $V_{m\acute{a}x}$, DELLOS SISTEMAS CATALIZADOS POR LA XDH.....	71
4.2.2.1	Variación con el pH de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ en el sistema xantina-XDH-ac.úrico y NAD^+ -XDH-NADH.....	71
4.2.2.2	Variación con el pH de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ en el sistema xantina-XDH-ac.úrico con el oxígeno como aceptor electrónico.....	74
4.3	GRUPOS SULFHIDRILO Y ACTIVIDAD XO Y XDH.....	78
4.3.1	INHIBICION DE LA XO POR PCMB.....	78
4.3.1.1	Carácter de la inhibición ejercida por el PCMB sobre la XO.....	79
4.3.1.2	Reversibilidad de la inhibición inducida por el PCMB sobre la XO	80
4.3.1.3	Efecto del 2-ME sobre la inhibición inducida por el PCMB sobre la XO.....	80
4.3.1.4	Cinética de la inhibición inducida por el PCMB sobre la XO.....	82
4.3.1.5	Valoración de grupos -SH de la XO con PCMB	82

	<u>Pág.</u>
4.3.2 ACCION NULA DEL DTNB SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA XO.....	84
4.3.3 INHIBICION DE LA XO CON LA NEM.....	84
4.3.3.1 Carácter de la inhibición ejercida por la NEM sobre la XO..	85
4.3.3.2 Cinética de la inhibición inducida por la NEM sobre la XO..	85
4.3.4 INHIBICION DE LA XO CON IAM.....	87
4.3.4.1 Carácter de la inhibición ejercida por la IAM sobre la XO..	87
4.3.4.2 Cinética de la inhibición inducida por la IAM sobre la XO..	89
4.3.5 INHIBICION DE LA XDH POR PCMB.....	93
4.3.5.1 Carácter de la inhibición ejercida por el PCMB sobre las actividades de la XDH.....	94
4.3.5.2 Reversibilidad por diálisis de la inhibición inducida por el PCMB sobre las actividades de la XDH.....	94
4.3.5.3 Cinética de la inhibición inducida por el PCMB sobre las actividades de la XDH.....	96
4.3.6 INHIBICION DE LA XDH CON DTNB, NEM Y IAM.....	99
4.4 INTERCONVERSION DE LA ACTIVIDAD OXIDASICA Y DESHIDROGENASICA.....	101
4.4.1 EFECTO DEL 2-ME SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA XO.....	101
4.4.2 EFECTO DEL NaHSO ₃ SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA XO.....	103
4.4.3 EFECTO DEL DTT Y DEL DTE SOBRE LA XO..	104
4.4.3.1 Efecto del tiempo de contacto de la XO con DTE o DTT.....	104
4.4.3.2 Efecto de la temperatura en el contacto de la XO con DTE o DTT.....	105

4.4.3.3	Concentraciones óptimas de DTE o DTT que inducen actividad deshidrogenásica en la XO.....	107
4.4.3.4	Actividad deshidrogenásica de la XO después de eliminar los reactivos DTE o DTT por diálisis.....	107
4.4.3.5	Parámetros cinéticos reales en la actividad deshidrogenásica inducida en la XO por DTE....	110
4.4.4	EFEECTO DE LAS PROTEASAS SOBRE LA XDH..	110
4.5	ESTUDIOS CINETICOS DE LA XO.....	114
4.5.1	DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE ACTUACION DE LA XO CON LA XANTINA COMO SUSTRATO.....	114
4.5.2	DETERMINACION DE LA K_M APARENTE DEL SISTEMA XANTINA- O_2 -XO-AC.URICO- H_2O_2 ...	116
4.5.3	INHIBICION POR AC.URICO DE LA ACTIVIDAD DE LA XO (CON RESPECTO A LA XANTINA.....	119
4.5.4	INHIBICION POR NADH DE LA ACTIVIDAD DE LA XO (CON RESPECTO A LA XANTINA).....	122
4.5.5	DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE ACTUACION DE LA XO CON LA HIPOXANTINA COMO SUSTRATO.....	126
4.5.6	DETERMINACION DE LA K_M APARENTE DEL SISTEMA HIPOXANTINA- O_2 -XO-XANTINA- H_2O_2	126
4.5.7	INHIBICION POR EXCESO DE HIPOXANTINA DE LA XO.....	129
4.5.8	INHIBICION POR ACIDO URICO DE LA XO (CON RESPECTO A LA HIPOXANTINA).....	133
4.5.9	DETERMINACION DE LA K_M APARENTE DEL SISTEMA NADH- O_2 -XO-NAD ⁺ - H_2O_2	133
4.5.10	INHIBICION POR NAD ⁺ DE LA XO (RESPECTO AL NADH).....	136
4.5.11	INHIBICION POR ACIDO URICO DE LA XO (CON RESPECTO AL NADH).....	142

4.5.12	ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA XO.....	146
4.6	ESTUDIOS CINETICOS SOBRE LA XDH.....	151
4.6.1	DETERMINACION DE LOS APARAMETROS CINETICOS DE LA XDH EN EL SISTEMA NADH-O ₂ -XDH-NAD ⁺ -H ₂ O ₂	151
4.6.2	INHIBICION POR NAD ⁺ DE LA XDH.....	151
4.6.3	INHIBICION POR EXCESO DE SUSTRATO NADH	161
4.6.4	INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.....	162
4.6.5	DEDUCCION DE LA ECUACION DE VELOCIDAD.	163
4.6.6	DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA XDH EN EL SISTEMA XANTINA-O ₂ -XDH-AC.URICO-H ₂ O ₂	169
4.6.7	INHIBICION POR ACIDO URICO DE LA XDH EN EL SISTEMA XANTINA-O ₂ -XDH-AC.URICO-H ₂ O ₂	173
4.6.8	DEDUCCION DE LA ECUACION DE VELOCIDAD PARA LA XDH EN EL SISTEMA XANTINA-O ₂ -XDH-AC.URICO-H ₂ O ₂	175
4.6.9	DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA XDH EN EL SISTEMA XANTINA-NAD ⁺ -XDH-AC.URICO-NADH.....	182
4.6.10	INHIBICION POR EXCESO DE SUSTRATO SOBRE LA XDH EN EL SISTEMA XANTINA-NAD ⁺ -XDH-AC.URICO-NADH.....	188
	4.6.10.1 Inhibición por exceso de xantina.....	188
	4.6.10.2 Inhibición por exceso de NAD ⁺	190
4.6.11	INHIBICION POR PRODUCTO.....	190
	4.6.11.1 Inhibición por ácido úrico...	190
	4.6.11.1.1 Xantina como sustrato variable.....	190
	4.6.11.1.2 NAD ⁺ como sustrato variable.....	192
	4.6.11.2 Inhibición por NADH.....	196
	4.6.11.2.1 Xantina como sustrato variable.....	196

4.6.11.2.2 NAD⁺ como sustrato variable..... 199

4.6.12 DEDUCCION DE LA ECUACION DE VELOCIDAD DE LA XDH EN EL SISTEMA XANTINA-NAD⁺-XDH-AC.URICO-NADH..... 203

4.6.13 ESTUDIOS CINETICOS DE LA XDH EN EL SISTEMA HIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA 211

4.6.14 DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE ACTUACION DE LA XDH EN EL SISTEMA HIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA..... 211

4.6.15 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA XDH EN EL SISTEMA HIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA..... 211

4.6.16 INHIBICION POR EXCESO DE SUSTRATO DE LA XDH EN EL SISTEMA HIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA..... 214

4.6.16.1 Inhibición por exceso de ácido úrico..... 214

4.6.16.2 Inhibición por exceso de hipoxantina..... 218

4.6.17 INHIBICION POR PRODUCTO (XANTINA) DE LA XDH CON EL SISTEMA HIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA..... 218

4.6.17.1 Inhibición con respecto al ácido úrico..... 218

4.6.17.2 Inhibición con respecto a la hipoxantina..... 221

4.6.18 DEDUCCION DE LA ECUACION DE LA XDH EN EL SISTEMA HIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA..... 225

5 DISCUSION..... 232

6 CONCLUSIONES..... 253

7 BIBLIOGRAFIA..... 259

1 I N T R O D U C C I O N
=====

1.1 GENERALIDADES

La xantinoxidasa, xantina:oxígeno-oxidoreductasa (EC 1.2.3.2) (1), fue descubierta por HORBACZEWSKI y SPITZER (2) (3) al observar que la hipoxantina y la xantina en presencia de varios preparados tisulares daban lugar a la aparición de ácido úrico, según la secuencia reaccional siguiente:



El enzima que catalizaba el proceso fue identificado rápidamente con el "enzima de Schardinger" de la leche y BURRIAN, en 1.905, (4), lo denominó xantinoxidasa, aunque posteriormente se observaron diferencias ; se halla muy difundido en los tejidos animales y en los microorganismos.

Se han propuesto diversos métodos de preparación de la xantinoxidasa de leche vacuna. En el de BALL (5), se emplea la lipasa pancreática y en el propuesto por CORRAN (6), se verifica la extracción del enzima con disolución de cloruro sódico. En el método de HORECKER y HEPPEL (7) se emplea la tripsina ; por último AVIS (8) consiguió la cristalización del enzima.

La xantinoxidasa de hígado de ternera ha sido purificada por KIELLEY (9), y la de hígado de cerdo por BRUMBY y MASSEY (10).

La xantindeshidrogenasa de hígado de pollo de elevado grado de pureza, ha sido obtenida por REMY y col. (11), mediante un tratamiento térmico, posterior incubación con Pangestina y fraccionamiento con sulfato amónico ; ha sido purificado, también, por RAJAGOPALAN y HANDLER (12), y GUBERT y col. (13) consiguieron la

separación cromatográfica de la lactatodeshidrogenasa y de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo.

La xantinoxidasa de procedencia bacteriana ha sido purificada por **NIKSTEIN** y col. (14), y por **BRADSHAW** y col. (15) ; la de insectos por **IRZYKIEWICS** (16) y la de riñón de pichón por **LANDON** y col. (17).

Alguno de los procesos mencionados preferentemente, se han mostrado de fácil adaptación a la purificación de xantinoxidasa de hígado de buey, uno de los enzimas de los que se ocupa el presente trabajo.

En estudios efectuados con purificados de xantinoxidasa de leche vacuna, LOWRY y col. (18) observaron al emplear 6-pteridilaldehído, inhibidor competitivo de la xantinoxidasa con respecto a la xantina, que una parte del enzima era inactivo ó no funcional y que esta cantidad ascendía aproximadamente al 40%. Conclusiones análogas fueron formuladas por MORELL (19) al leer a 450 nm los descensos de absorbancia provocados por la adición de xantina a la xantinoxidasa en anaerobiosis. Se observaba un descenso rápido de absorbancia, que se producía al cabo de 30 segundos y otro más lento que se prolongaba durante algunas horas. El cambio rápido debía ser proporcional a la cantidad de enzima funcional presente en el preparado enzimático, que ha sido reducido por la xantina; el más lento lo provocaría la reducción del enzima no funcional por medio del enzima activo reducido.

Otros autores (20), (21), (22), (23), (24), (25), obtuvieron también una evidencia directa de la existencia de formas enzimáticas inactivas. Se basaba aquélla, en la variación de los contenidos de Fe, de flavina y de Mo, componentes que se encuentran en todos los preparados de xantinoxidasa purificada y de la relación de dichos componentes con la actividad xantina:oxígeno reductasa.

La observación de las señales bajas secundarias de EPR permite el formular conclusiones análogas (20) ; se admite la existencia de dos formas de xantinoxidasa, una activa ó funcional y otra no funcional inactiva, con unas relaciones de Mo:FAD:Fe de 1:1:4 y de 0:1:4 respectivamente.

Si bien se ha postulado que la reducción bifásica de la xantinoxidasa en presencia de xantina (450 nm) es una propiedad intrínseca del enzima, se ha podido demostrar (26), que la diferencia en los intervalos de tiempo en los que se observan las fases rá-

pida y lenta depende de la naturaleza del sustrato, tal como se pone de manifiesto al emplear diez sustratos distintos.

Se han formulado distintas hipótesis para explicar la actividad ó inactividad de la molécula de xantinoxidasa ; así DIXON (27) observó una aparente irreversibilidad en la inhibición de la xantinoxidasa inducida por el ión cianuro ; exhibe el enzima inhibido, una variación en el espectro de absorción a 320 mμ, y su cinética de inhibición muestra que el ión cianuro interfiere en la unión de la molécula de xantina al centro catalítico del enzima (28). El cambio de absorción está provocado por una variación en la coordinación del molibdeno, ya que la absorción a esta longitud de onda se debe en su mayor parte a la flavina y al hierro no hemático que se hallan presentes en la molécula del enzima (29). La relación de este hecho con la señal EPR del molibdeno, permite afirmar que, puesto que la xantina se une al centro catalítico del enzima a través del molibdeno (30), al formarse el complejo cianuro-molibdeno ya no tendría lugar la transferencia electrónica entre la purina y el metal (31). Ello conduciría a la hipótesis de que son comparables el enzima funcional y el no funcional con el enzima que no ha sido tratado con cianuro y el que ha sido inactivado por dicho ión.

Otro autores (32), no aceptan la hipótesis de la formación del complejo ni su posible extensión a la comparación con el enzima no funcional ; la negativa se basa en que al tratar el enzima con cianuro, aparece tiocianato que se forma a partir del azufre constituyente que no se halla unido al hierro en la molécula enzimática. Es significativo el hecho de que la pérdida de actividad enzimática es proporcional al tiocianato liberado. Estos resultados condujeron a postular que el tiocianato procede de los átomos de azufre constituyentes de un grupo persulfuro, que se encuentra en el centro catalítico del enzima, según el siguiente esquema:



Cuando el enzima así tratado se incubaba con sulfuro sódico, se recuperaba la actividad y el grado de recuperación depende del tiempo

po de contacto, de la temperatura y del pH. Si se utiliza sulfuro sódico con azufre marcado isotópicamente y se vuelve a inactivar el enzima con el ión cianuro, el azufre marcado aparece en el tiocianato formado (32). La hipótesis ha sido confirmada posteriormente por EDMONSON y col. (33) al separar el enzima activo del inactivo por cromatografía de afinidad ; una vez aislado el enzima no funcional, se conseguia su actividad al incubarlo con sulfuro sódico. Ha podido comprobarse también que el enzima no funcional posee las mismas características que el enzima inactivado por cianuro, que ambos contienen la misma proporción de molibdeno y que su espectro de absorción a 320 nm es análogo. Asi mismo, los estudios de EPR muestran que el enzima no funcional, al igual que el inactivado por cianuro, no se reduce en presencia de la mantina (33). Es importante destacar, que tanto el enzima no tratado como el inactivado por cianuro, poseen actividad diaforásica ; es decir catalizan la oxidación del NADH a NAD^+ , utilizando el ferricianuro como aceptor electrónico (31). El comportamiento del enzima es comprensible ya que, en la formación del complejo intermedio enzima-NADH no interviene el grupo persulfuro, sino que se forma a partir del grupo prostético flavina. Por otra parte, el enzima desflavinizado carece de actividad diaforásica (34), lo que confirma esta hipótesis.

1.3 CENTRO CATALITICO DE LA XANTINOXIDASA Y TRANSFERENCIA ELECTRONICA

El establecimiento del posible mecanismo químico de actuación de la xantinoxidasa, el dilucidar en que forma ocurre la transferencia electrónica en las diferentes etapas de reacción, así como el conocimiento de los grupos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato han sido objeto de una amplia investigación.

BAKER y HENDRIKSON (35) utilizaron numerosos sustratos e inhibidores con objeto de determinar cuales son los grupos indispensables de la molécula del sustrato o del inhibidor a través de los que se fija a la molécula del enzima y cual debe ser la distribución de aquéllos para que se verifique el acto catalítico. Postularon (loc.cit.), que cuando en el anillo de la purina no existe un grupo tiol, hidroxilo o amino en posición 6, la unión que se establece es muy débil. Sin embargo, la presencia de un grupo tiol en posición 2 determinaba que la unión al enzima fuese más estable que si aquella se hallaba ocupada por un grupo hidroxilo. La presencia de más de un grupo hidroxilo en el anillo de la purina determinaba, que la unión enzima-sustrato se viera menos favorecida. Pudieron concluir (35), que resultaba necesaria la presencia de grupos tiol, hidroxilo o amino en posiciones 2, 6 ó 8 del anillo de la purina y que la afinidad era máxima cuando existía un solo sustituyente, pero si se hallaban ocupadas las tres posiciones el enzima experimentaba inhibición debido a que el sustrato no dispone de ninguna posición para que se verifique la hidroxilación enzimática.

En la xantindeshidrogenasa de *Micrococcus lactylicus* (36) las representaciones de Dixon conducen a suponer, que tanto la unión del enzima con el sustrato como la catálisis, dependen de grupos ionizables a pH 6,5 ; 7,5 ; 8 y 9,5 aproximadamente.

La iodoacetamida inhibe con rapidez a la xantinoxidasa (37) ; el reactivo pone de manifiesto la presencia de un grupo sulfhidrilo

en el centro activo del enzima, que se sugiere proceda de un grupo persulfuro. Se ha supuesto, también, que el efecto provocado por la iodoacetamida es el de alquilar la flavina en las posiciones 4 a 6 5 (38) (39) (40).

La inhibición de la xantinoxidasa de leche por el p-mercuribenzoato precisa de la presencia de la xantina, siendo el carácter de la inhibición con respecto a ésta de tipo competitivo ; sin embargo, con el enzima de hígado de cerdo la inhibición es no competitiva, lo que podría ser indicio de diferencias de constitución de las moléculas de ambos enzimas.

La inhibición de la xantinoxidasa por el alopurinol (41), análogo estructural de la hipoxantina, se interpreta por comportarse éste como sustrato que se transforma en aloxantina (isómero de la xantina), la cual no se libera ; se forma un complejo enzima-aloxantina que impide la actuación del oxígeno sobre el enzima y se anula así la capacidad catalítica deléste. El alopurinol es asimismo un inhibidor pseudoirreversible de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo (42).

La existencia de dos átomos de molibdeno por molécula de xantinoxidasa (33) determina la existencia de dos centros catalíticos ; por tanto, si se tiene en cuenta que cada una de las hemimoléculas de xantinoxidasa de leche y de xantindeshidrogenada de hígado de pollo pueden existir en dos formas, funcional y no funcional, se pueden originar tres tipos de molécula enzimática : uno cuyas moléculas posean dos centros catalíticamente activos ; otro cuyas moléculas posean un centro activo y otro inactivo y el tercero en el que ambos centros sean catalíticamente inactivos. La hipótesis se basa en que la carencia de funcionalidad de las hemimoléculas sea debida a una sola causa ; ahora bien, se sabe que ésta puede achacarse a dos causas fundamentales. La primera de ellas sería un factor de procedencia al que sería imputable la ausencia de molibdeno, en mayor o menor proporción, debido probablemente a factores dietéticos, y la segunda a una ausencia del grupo persulfuro, que quedaría reducido a sulfuro con pérdida de su actividad catalítica ; el último fenómeno dependería de causas externas como podría ser el proceso de purificación

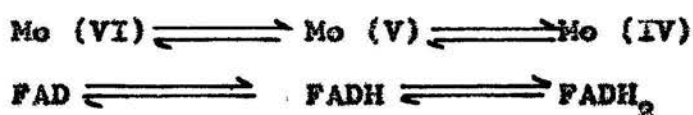
y el tiempo y modo de conservación del enzima (43). La hipótesis se hallaría en concordancia con la separación de las formas funcional y no funcional conseguida por el uso de la cromatografía de afinidad. Mediante este método se separarían las moléculas que contienen uno o dos centros activos (enzima funcional) de las que no poseen ninguno (enzima no funcional).

Los estudios de inhibición por cianuro (32) y los de desflavinización del enzima (34) permiten comprobar que el NADH se une a una forma del enzima distinta de la que lo hace la xantina, ya que los grupos que catalizan ambas oxidaciones son distintos; así el molibdeno y el grupo persulfuro son esenciales para la oxidación de la xantina, aunque su ausencia no impide la oxidación del NADH, mientras que la desflavinización del enzima determina que éste no sea capaz de fijar la molécula de NADH, ni de catalizar su oxidación. La desflavinización no implica la pérdida de la capacidad de fijación de la xantina y de que ésta reduzca el enzima, si bien su posterior reoxidación se deberá efectuar por un cofactor distinto del NAD^+ o del oxígeno, tales como el ferricianuro o el citocromo c. Estos resultados concuerdan con los descritos por BRAY (44) (45) (46), quien al efectuar estudios de EPR con la xantinoxidasa de leche, observó la ausencia de las señales del hierro y del molibdeno cuando ésta utiliza NADH como sustrato, pero obtuvo señal para la flavina, si bien fue débil. La secuencia de la transferencia electrónica propuesta por el autor es la siguiente: sustrato, molibdeno, flavina y Fe/S (44).

PALMER (47) al estudiar las etapas de oxidación y de reducción de la xantinoxidasa, mediante técnicas de EPR y dicroísmo circular, encontró dos señales para el grupo S/Fe. Se deduce que los cuatro átomos de azufre y los cuatro átomos de hierro, pueden hallarse unidos ; los dos átomos de hierro a través de los dos átomos de azufre. Cada uno de éstos dos grupos así obtenidos produce una señal distinta de EPR lo que induce a pensar que la transferencia electrónica se sucede de uno a otro de los grupos S/Fe.

En un intento de establecer el mecanismo químico orgánico de ac

tuación de la xantinoxidasa de leche OLSON y col. (48) postularon que existen dos fases en la reacción de oxidación, indicando que sólo una de ellas es catalíticamente significativa por ser limitante de la reacción; esta fase resulta ser independiente de la actividad de la relación flavínica (AFR), de la presencia de inhibidores competitivos de la xantina, del tratamiento de la xantinoxidasa por alopurinol o por cianuro, o bien de la presencia de superóxido dismutasa. Al efectuar un estudio completo del mecanismo de actuación de la xantinoxidasa de leche (49), se ha postulado que los cambios ópticos y del espectro de EPR durante la valoración anaerobia de la xantinoxidasa de leche con ditionito, pueden ser provocados por el equilibrio redox

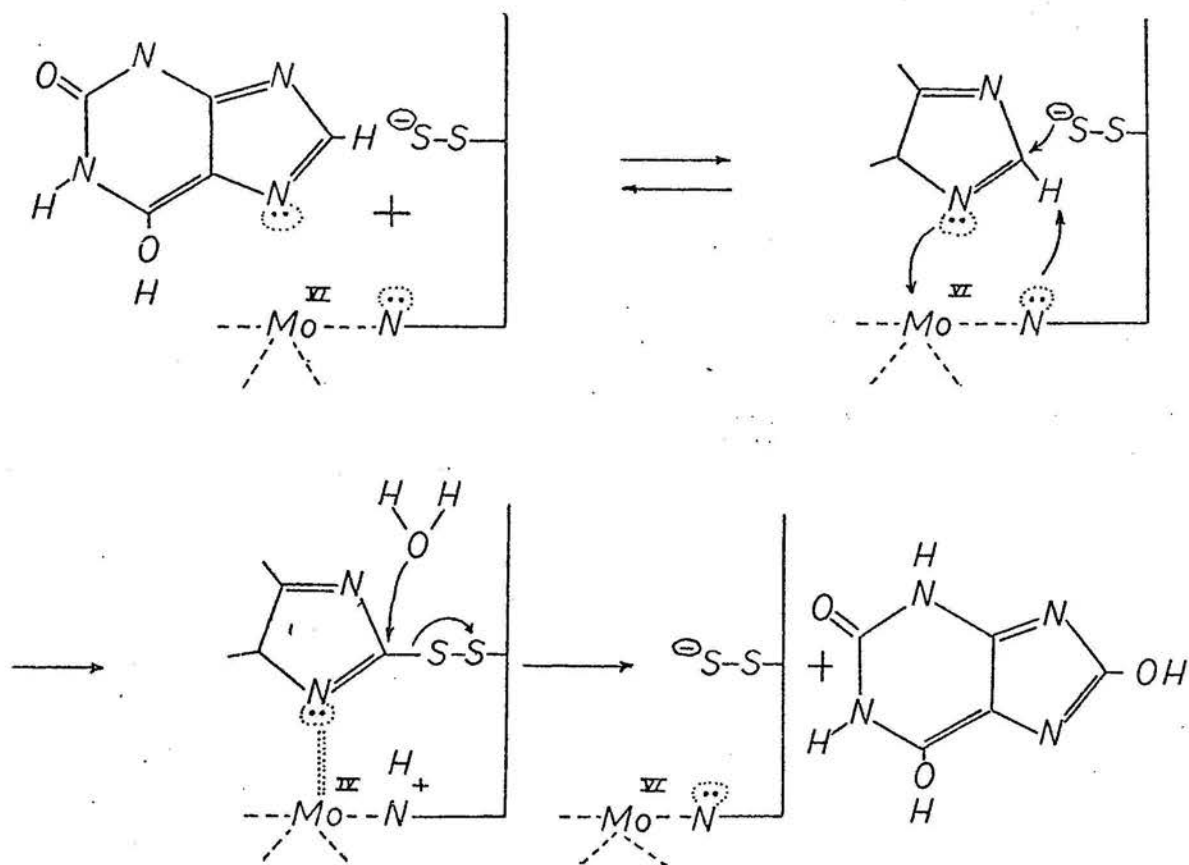


y de un electrón de cada uno de los dos centros S/Fa existentes. Los valores de las constantes de equilibrio obtenidas permiten formular que deben existir 36 estados posibles de oxidación en la reducción enzimática de cada hemimolécula de xantinoxidasa (49), y se ha sugerido, también, la hipótesis de que el pH afecta de forma importante a la probabilidad de que tenga lugar cada uno de los 36 casos de reducción. Al mismo tiempo se observa que la transferencia electrónica es mucho más rápida que el turnover, luego ninguna de estas transferencias puede considerarse como etapa limitante de la reacción.

Por todo lo expuesto se adopta como modelo de enzima una forma tal en la que cada unidad enzimática es una hemimolécula, la cual está considerada como la cantidad de enzima que contiene un átomo de molibdeno y es capaz de aceptar tres pares de electrones procedentes de tres moléculas de xantina, mediante un proceso de cesión consecutivo e irreversible. A partir de las ecuaciones de equilibrio es posible calcular con exactitud el intervalo de tiempo necesario para la reducción de la flavina y de los centros S/Fa, y conocer también, la velocidad de decoloración de la flavina.

Al formular la existencia, de complejos enzima-xantina se puede explicar la participación y dependencia de las señales rápida y muy rápida del espectro de EPR correspondientes al molibdeno y los efectos del isótopo deuterio durante la cinética del estado estacionario y de transición. Igualmente con el modelo propuesto por OLSON (49) es posible explicar los cambios observados en el espectro de EPR durante la reacción del enzima reducido con el oxígeno molecular, así el FADH_2 reacciona rápidamente con el oxígeno. Se puede concluir, que este modelo explica el hecho significativo de que los centros S/Fe actúen como un acumulador de electrones para que el molibdeno pueda hallarse en el estado de oxidación VI y la flavina se encuentre en forma totalmente reducida.

El mecanismo propuesto por OLSON y col. (loc.cit.) para la unión de una molécula de sustrato xantina, posterior liberación del producto, el ácido úrico, de la cadena de tres adiciones y tres liberaciones sería el siguiente:





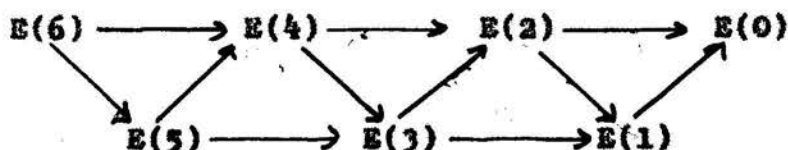
pudiendo ser $i=0, 2$ ó 4 electrones según acepte el enzima la primera, la segunda o la tercera molécula de xantina. En este mecanismo aparece $E'X(i+2)$, nueva forma de complejo enzima-xantina que ha aceptado dos electrones.

La primera etapa es la unión simple de la xantina al centro activo de la molécula enzimática, instante en que se produce el ataque al grupo persulfuro, acusando la rotura del enlace simple carbono-hidrógeno, en posición 8, que va acompañada de la cesión de un par de electrones al átomo del molibdeno (VI) ; al mismo tiempo, de forma concertada, el hidrógeno en posición 8 de la molécula de xantina, al romperse su enlace con el carbono, es aceptado por un grupo básico (probablemente un átomo de nitrógeno contiguo al molibdeno, aunque no ha sido demostrado). En la siguiente etapa, el átomo de molibdeno se estabiliza mediante la cesión del par de electrones, que había aceptado, al centro de la flavina y a los S/Fe, siempre que éstos se encuentren en condiciones de aceptarlos, y queda de nuevo el molibdeno en forma de molibdeno (VI). Finalmente, por medio del ataque de una molécula de agua, se hidroliza el enlace xantina-persulfuro, el hidroxilo del agua se une a la molécula de xantina en posición 8, la cual se convierte en el producto de la reacción, el ácido úrico.

Al determinar el mecanismo de la reacción se observa que la velocidad máxima varía con el pH lo que sugiere, que no sea solamente el grupo hidroxilo el que intervenga en el ataque directo de la unión entre la xantina y el grupo persulfuro de la xantina oxidasa (33) (48). Las dos fases más significativas de este mecanismo son la rápida rotura del enlace carbono-hidrógeno de la xantina, durante la formación del complejo $E'X(i+2)$, y el enlace de la molécula de xantina oxidada con el molibdeno en estado reducido. Puede constituir una confirmación de la suposición el que al sustituir el átomo de hidrógeno en la posición 8 del anillo de la purina por un átomo de deuterio, se observa que el valor de la constante de Michaelis se hace dos veces menor, pero no se producen variaciones apreciables en el valor de la velocidad

máxima (50).

La reacción del enzima en estado reducido con el oxígeno molecular se realiza en dos fases perfectamente diferenciadas que se ponen de manifiesto mediante técnicas de EPR (48). En el estado de máxima reducción del enzima se transfieren seis electrones ; en una primera etapa se ceden cinco electrones y en la segunda, que se verifica a velocidad mucho menor, tiene lugar la transferencia del electrón residual. Este último se intercambia por reacción directa del oxígeno molecular con el radical semiquinona presente en la molécula de xantinoxidasa. La reacción del enzima reducido con el oxígeno puede expresarse por la secuencia:



Este caso es el más complejo ya que la molécula enzimática se halla en estado de máxima reducción ; es decir, posee seis electrones adicionales.

Este mecanismo es el que se acepta principalmente, aunque si las concentraciones de sustrato son altas se debe suponer la existencia de actividad dismutasa, que explique las mayores velocidades obtenidas, y que de esta forma no quedan perfectamente explicadas.

La denominación de xantinoxidasa se debe a que el enzima es capaz de oxidar a la xantina utilizando el oxígeno como acceptor electrónico, si bien puede emplear otros aceptores electrónicos distintos a éste ; es decir, el enzima reducido es susceptible de oxidarse, tras liberar ácido úrico, por medio de aceptores electrónicos como: el azul de metileno, el diclorofenolindofenol, el ión ferricianuro, el ión nitrato, la quinona, el citocromo c, el peróxido de hidrógeno, el dinitrotolueno, el ión permanganato, el ión ioduro, la aloxana, el trinitrotolueno, la furacina, el ácido picrico, el metasulfato de fenacina, las sales de tetrazolio y el NAD^+ .

La literatura científica, denomina habitualmente xantindeshidrogenasa al enzima que cataliza la oxidación de la xantina con el NAD^+ como acceptor electrónico, con preferencia al empleo de oxígeno.

Resulta difícil considerar las xantinoxidasas y las xantindeshidrogenasa como enzimas puros, ya que aunque predomine una de las dos actividades en los preparados enzimáticos, difícilmente se encuentran éstos exentos de la otra. Parece una característica importante en la evolución, del hecho de que cuanto más avanzado se halla un animal en la escala evolutiva, la proporción de actividad xantinoxidásica, que aparece, es mayor, pero si los animales carecen de uricasa, la actividad xantindeshidrogenásica que se observa es mayor de la esperada. Así se observa que la xantindeshidrogenasa de las aves exhibe una actividad con NAD^+ que es muy superior a la que manifiesta con el oxígeno ; según REMY y col (11) esta última es del orden del 1% en el enzima procedente de hígado de pello. En los mamíferos el fenómeno es inverso ; la actividad predominante es la oxidásica y es decir, el oxígeno es utilizado como acceptor electrónico con preferencia al NAD^+ . La actividad deshidrogenásica predomina también en el enzima procedente de los peces, los anfibios y los reptiles, así como en los invertebrados (51).

La coexistencia de ambas actividades ha inducido a intentar su separación, al formular la hipótesis de que fuesen formas enzimáticas algo distintas. No se lograron resultados positivos aunque se pudo comprobar que las actividades de cada forma, oxidásica y deshidrogenásica, eran aditivas, lo que podría constituir un indicio de que no debería existir competencia entre el NAD^+ y el oxígeno por el mismo centro (51). Parece pues que lo que realmente ocurre es que en un determinado tejido del organismo existe una sola forma del enzima, en la que predominará la actividad oxidásica o deshidrogenásica según su procedencia.

La hipótesis anterior ha inducido a tratar de transformar moléculas del enzima con actividad oxidásica (tipo O), en otras que posean actividad de deshidrogenasa (tipo D), ambas demostrables por la variación de las respectivas actividades frente a diversos aceptores electrónicos ; se ha tratado de conseguir el objetivo mediante procesos de purificación de los preparados enzimáticos, y también provocando alteraciones en la molécula enzimática.

La xantinoxidasa de hígado de rata recién preparada muestra actividad deshidrogenásica, pero al ser tratada por reactivos de los grupos tiol, como el cobre (II), el 5,5'-ditiobis (2-dinitrobenzoico), la N-etilmaleimida y el p-cloromercuribenzoato (52) (53), el enzima exhibe actividad oxidásica. El tratamiento prolongado de la xantindeshidrogenasa de hígado de rata por los reactivos anteriormente mencionados provocaba su inactivación que era impedida por el ditiotreitól y el ditioeritritól (52) (53). La xantindeshidrogenasa de hígado de rata conservada a -20°C (54) se convierte en oxidasa, pero la transformación no ocurre en presencia de ditiotreitól o ditioeritritól. Una vez transformada la deshidrogenasa (tipo D) en oxidasa (tipo O), se puede invertir el proceso mediante el empleo adecuado de los mismos reactivos citados.

En experiencias análogas efectuadas con la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo (54) presente en homogeneizados y preparados de alto grado de pureza, no se logró que apareciese actividad de

oxidasa (tipo 0) (55).

En la obtención de purificados de xantinoxidasa de hígado de rata, se observa que si los diversos tratamientos no se efectúan en presencia de los reactivos protectores, ditiotritol y ditiocritritol, añ cazima sólo conserva su actividad de oxidasa. La xantinoxidasa procedente de otros tejidos de rata conduce a la obtención de enzima con actividad tipo oxidasa (0), si bien el procedente del intestino es susceptible de convertirse en deshidrogenasa, al ser tratado con cualquiera de los dos reactivos anteriormente citados (55).

El enzima de hígado de rata adquiere actividad oxidásica, en el tratamiento con enzimas proteolíticos (56), siendo muy utilizada la tripsina cán este objeto ; la xantinoxidasa de hígado humano exhibe un comportamiento análogo al descrito para la de hígado de rata.

Las experiencias reseñadas demuestran que es posible inducir la aparición de actividad xantinoxidasa a partir de la actividad xantindeshidrogenasa que se halla presente en los tejidos de rata (57).

Por el momento no ha podido establecerse el modo como suceden éstas transformaciones, que se ha sugerido sean debidas a la presencia de grupos sulfhidrilo lábiles, cuya presencia no ha podido determinarse. Por otra parte, tampoco se sabe cuál es la forma de enzima (oxidasa o deshidrogenasa), que se halla presente en el animal vivo, ya que bien pudiera ser que el enzima varíe de propiedades a lo largo del proceso de aislamiento y purificación.

1.5

OTRAS TRANSFORMACIONES CATALIZADAS POR LA XANTINOXIDASA Y LA XANTINDESHIDROGENASA

La xantinoxidasa de leche cataliza la dismutación de la xantina en hipoxantina y ácido úrico, a pH 7 y a 37°C en anaerobiosis; el fenómeno ha sido descrito por GREEN (58), pero en el curso de la reacción no determina la hipoxantina formada y sólo puede medir el ácido úrico que aparece en incubaciones de tres horas por lo menos.

LANDON (17), trabajando con el enzima procedente de riñón de pollo, no observó que se produjese la reacción de dismutación.

Se ha estudiado también la reacción con xantinoxidasa de *Micrococcus lactylicus*, que utiliza como aceptores electrónicos la ferredoxina, el ferricianuro y el oxígeno, pero no el NAD^+ (36); si bien difiere de los enzimas del pollo y de la leche en que su peso molecular es de 250.000, la composición en Mo:FAD:S/Fe es idéntica para todos ellos y se ha observado que el enzima de esta procedencia es inhibido por el metanol y por los iones borato, pero es resistente a la inactivación por el cianuro y el arsenito. Cataliza el mencionado enzima (36) la dismutación reversible de la xantina, con una velocidad que es aproximadamente el 60% de la que exhibe en la oxidación de la xantina con el oxígeno. El curso de la reacción de dismutación se siguió por medida de los descensos de densidad óptica a 279 nm que corresponde al punto isobéptico de la xantina y del ácido úrico a pH de 7,4. La cantidad de hipoxantina formada en estas condiciones fue el 60% de la cantidad de ácido úrico que se produce en aerobiosis.

La xantinoxidasa de leche en anaerobiosis da lugar a la formación de una cantidad de ácido úrico que equivale al 1% (36) de la que forma el enzima en condiciones aerobias.

En experiencias de la reacción inversa a la de dismutación se obtuvieron mezclas de 6,8-dihidroxi-purina, de xantina, de hipoxantina y de ácido úrico.

xantina y de ácido úrico, lo que es indicio de que no sólo se forma xantina sino también su isómero, la 6,8-dihidroxi-purina, que debe ser un producto significativo del metabolismo de estos microorganismos. Sugieren los autores (36) que la intervención del molibdeno en la reacción es fundamental, si bien las representaciones de Dixon ($\log V_{\text{máx.}} / pK_M$ frente a pH) dan lugar a resultados análogos a los que se obtienen con el mismo enzima utilizando el oxígeno como aceptor electrónico.

PRIEST y col. (59) (60) trataron de determinar si la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo provocaba la reacción de dismutación, a fin de interpretar la producción excesiva de ácido úrico observada por ellos. Los resultados obtenidos demostraron que la reacción no tenía lugar con el enzima de esta procedencia, y que las aparentes activaciones observadas en las representaciones cinéticas no podían atribuirse, en modo alguno, a la reacción de dismutación.

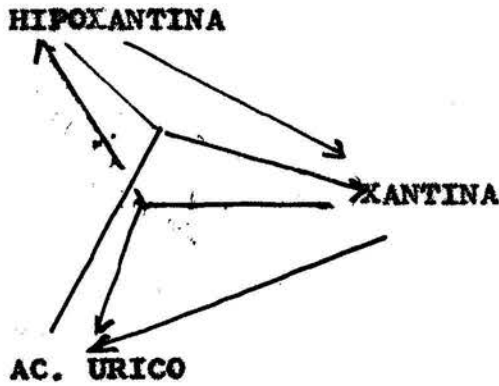
La reacción inversa a la de dismutación, es decir, la conversión de la hipoxantina en xantina, por medio de la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo, utilizando el ácido úrico como aceptor electrónico (61) transcurre favorablemente a pH inferior al fisiológico, pero si éste es superior a 7 la magnitud de esta transformación resulta despreciable.

Los hechos expuestos permiten poner de manifiesto, que las xantinoxidasas y las xantindeshidrogenasas, catalizan los siguientes tipos generales de reacción:



A.E.O. y A.E.R. representan el aceptor electrónico oxidado y reducido respectivamente.

Los procesos en los que intervienen la hipoxantina, la xantina y el ácido úrico se pueden describir mediante el siguiente esquema:



La complejidad del esquema se hace mayor si se consideran los distintos sustratos y aceptores electrónicos que pueden ser utilizados.

Para establecer los mecanismos de reacción de los diferentes sistemas en los que intervienen tanto la xantinoxidasa como la xantindeshidrogenasa, se ha tenido presente el pH óptimo de actuación. Se halla comprendido en el intervalo de pH 8 y 8,5 para las reacciones en las que los sustratos reducidos son la xantina y la hipoxantina, e igualmente la mayoría de sus análogos estructurales. Sin embargo, cuando el sustrato reducido es el NADH, en la reacción diaforásica, la zona de pH óptimo se desplaza unas 4 unidades de pH hacia la zona ácida (62).

La xantinoxidasa de leche experimenta inhibición por exceso de sustrato, en presencia de diversos aceptores electrónicos como el azul de metileno (63), el oxígeno (64) (65), el metasulfato de fenacina (66) y no lo hace en presencia de citocromo c.

La xantinoxidasa de hígado de cerdo (10) y la de hígado de pollo (12) son inhibidas por exceso de sustrato, pero con el enzima de origen bacteriano (15) (36) se observa que se produce un incremento en la velocidad de producción de ácido úrico, que es atribuido a la reacción de dismutación de la xantina (66).

En el intento de establecer el mecanismo cinético de la xantinoxidasa de leche (67) se obtienen rectas paralelas al efectuar las representaciones de $1/v$ frente a $1/S$, para concentraciones variables de los sustratos xantina y oxígeno, sugiriendo se trate de un mecanismo ping-pong, pese a ciertas anomalías observadas en distintas condiciones (68) (69) (70).

Experiencias análogas, efectuadas con xantindeshidrogenasa de hígado de pollo y NAD^+ como aceptor electrónico (12) (71), sugieren que también se adapte a un mecanismo ping-pong (72) (73). En éste, al liberarse el producto de una primera semirreacción queda el enzima libre en estado reducido, que reacciona a su vez con el aceptor electrónico en su forma oxidada y lo reduce,

volviendo a quedar el enzima nativo oxidado, en su forma original. Todo ello está de acuerdo con los resultados expuestos por OLSON (48) (49) y por EDMONSON (50) que se adaptan al esquema de reacción más aceptado.

Es posible también que un mecanismo en el que interviniera la formación de complejos ternarios, diese lugar a la aparición de líneas paralelas en la representación de Lineweaver-Burck, lo que no sería de esperar de acuerdo con los datos disponibles; debería demostrarse su existencia mediante el empleo de inhibidores competitivos del sustrato y del aceptor electrónico, así como por el estudio de la inhibición por el producto de la reacción.

En la bibliografía consultada no aparece formulado ningún mecanismo de forma completa, ya que los autores que han abordado el problema, se han limitado a utilizar representaciones frente al sustrato variable y no frente al aceptor electrónico, ni tampoco han efectuado el estudio de la inhibición producida por los productos de la reacción.

Por otra parte (60) (74) se ha descrito que tanto la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo como la de pavo se adaptan a cinéticas no lineales y muestran líneas paralelas únicamente en un intervalo de concentraciones del sustrato muy limitado. Se sugiere la formación de un complejo que no es característico de los mecanismos ping-pong, que daría lugar a la aparición de representaciones de Lineweaver-Burck que no son lineales y que se han observado al trabajar con la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo en un amplio intervalo de concentraciones de sustrato. Estos resultados darían lugar a un esquema reaccional muy complejo en el que las dos semirreacciones ya no serían separables, tal como se había propuesto.

ACTIVACION DE LA XANTINOXIDASA

La xantindeshidrogenasa de hígado de pollo y las xantinoxidasas de *Micrococcus lacticus*, y de *Clostridium cylindrosporum* (15), al actuar sobre concentraciones de sustrato elevadas exhiben velocidades iniciales de reacción mayores que las esperadas ; en la representación de Lineweaver-Burck aparece una deflexión hacia abajo perdiendo su linealidad (12) (30). El fenómeno descrito es de signo inverso al de inhibición por exceso de sustrato hallado por diversos autores (63) (64) (65) (75) (10) (12).

La activación de la xantinoxidasa por el exceso de sustrato ha sido explicada de formas diversas. Así, en el enzima procedente de *Micrococcus lacticus* (12) (30), se sugiere que la molécula del sustrato xantina, se comporte a la vez como dador ó como aceptor de electrones, lo que supone que tiene lugar un fenómeno de dismutación de la xantina en el que aparecen hipoxantina y ácido úrico. El hecho es análogo al mencionado por GREEN (58), con las salvedades a las que se hizo referencia en apartados anteriores.

En el caso de los microorganismos de referencia, la reacción de dismutación puede ser calificada como metabólica, ya que por su magnitud cabe suponer que se trate de un mecanismo auxiliar del de oxidación normal de las purinas, si bien se carece de la evidencia que confirme esta hipótesis.

Sin embargo, cuando se trata del enzima de *Clostridium cylindrosporum* (15), los datos obtenidos indicarían que tiene lugar un mecanismo de activación, en el que se presupone la existencia de dos centros enzimáticos de unión para el sustrato xantina. La unión del sustrato con uno de los dos centros provocaría la oxidación de la xantina a ácido úrico, mientras la unión al segundo centro induciría una modificación en la conformación enzimática que implicaría, a su vez un incremento de la velocidad de catálisis.

En la explicación de este posible mecanismo sugieren los autores que puede emplearse una ecuación cinética compleja tal como la propuesta por KISTIAKOWSKY y col. (76) y adaptada por ALBERTY y col. (77) para la fumarasa. En el caso de la fumarasa proponen otra ecuación si se supone que ambos centros enzimáticos sean iguales y ejerzan influencia mutua.

Con objeto de establecer si la xantindehidrogenasa de hígado de pollo, cuando se comporta como oxidasa, cataliza la reacción de dismutación o bien se trata de una posible activación, PRIEST y col. (59) efectuaron diferentes experiencias demostrando que no existía en ningún caso acumulación de hipoxantina ya que aunque ésta fuese capaz de transformarse en xantina, la presencia de concentraciones elevadas de ésta determinarían la consiguiente transformación en hipoxantina. Sin embargo, los puntos isobéuticos aparecen definidos muy claramente, lo cual indica de modo inequívoco que la reacción de dismutación no tiene lugar. Los mencionados autores (60) intentan explicar los fenómenos de activación mediante la elaboración de un modelo matemático adecuado, que permite explicar las distintas desviaciones de la linealidad que se observan en las representaciones de Lineweaver-Burck. Mediante la utilización de estos modelos teóricos han podido llegar a establecer que la xantindehidrogenasa de hígado de pollo es un enzima que posee un centro catalítico con tres zonas de unión, para los distintos sustratos y productos, considerando el agua como un sustrato. Asimismo elaboran una ecuación empírica que se adapta perfectamente a los resultados obtenidos experimentalmente. El mecanismo cinético considerado para la actuación del enzima es al azar, pero cuando se trabaja con concentraciones de sustrato para las que aparentemente las representaciones de Lineweaver-Burck se adaptan a la linealidad, da lugar a un mecanismo aparentemente ping-pong, ya que las desviaciones más acusadas de la linealidad en las mencionadas representaciones ocurren para concentraciones de sustrato muy elevadas o muy bajas.

El mecanismo al azar de liberación de productos es un mecanismo

amplio que comprende, según las condiciones, tanto un mecanismo ping-pong en su comportamiento general, como la fijación de sus trato o liberación de producto al azar.

La base teórica para la elaboración de los modelos cinéticos de catálisis enzimática ha sido formulada por FISCHER y col. (78), quien también ha establecido las bases para la elaboración de mó delos al azar (79) (80). Estos sistemas han sido aplicados a otros enzimas como la glutamatodeshidrogenasa de hígado de buey (81).

2

OBJETO DEL TRABAJO
=====

El comportamiento de las xantinoxidasas y las xantindeshidrogenasa de diferentes procedencias, presenta similitudes y diferencias. Estriban aquéllas, en el empleo de aceptores comunes y son patentes las diferencias exhibidas en cuanto a los porcentajes de actividad oxidásica y deshidrogenásica, del enzima de varios orígenes.

En el presente trabajo, se ha considerado de interés la comparación de dos enzimas de procedencia hepática, uno considerado como oxidasa, la xantinoxidasa de procedencia bovina, y el otro como una deshidrogenasa típica, la xantindeshidrogenasa de pollo.

Se ha procedido a la obtención de un purificado de xantinoxidasa de hígado de buey, cuya descripción no figura en la bibliografía, habiéndose utilizado preparados de xantindeshidrogenasa de hígado de pollo obtegidos por técnicas ya conocidas. La disposición de preparados purificados de ambas enzimas se muestra necesaria para el estudio efectuado.

En la comparación de la forma de actuación de ambas enzimas, se han determinado algunos de los grupos que forman parte de los centros activos, poniendo de relieve, las discrepancias y diferencias fundamentales, entre las que destaca el hecho de que únicamente la xantindeshidrogenasa es capaz de utilizar el NAD^+ como aceptor electrónico.

Asimismo, se ha procedido a considerar el efecto de los reactivos de grupos sulfhidrilo sobre las actividades características de ambas enzimas.

La posibilidad de transformación de formas enzimáticas con actividad oxidásica en otras que exhiben actividad deshidrogenásica y viceversa, ha sido también objeto de estudio.

Se ha establecido el comportamiento cinético de ambas enzimas, frente a los diferentes sustratos cuya transformación catalizan. Con la xantinoxidasa de hígado de buey se han considerado la xantina, la hipoxantina y el NADH, sustrato este último, de la reacción diaforásica. Con la xantindeshidrogenasa de hígado de pollo se ha estudiado el comportamiento frente a la xantina y el NAD⁺, como sustratos fisiológicos, y la reacción diaforásica, que este enzima también tiene lugar.

Se ha establecido un posible mecanismo cinético para la interpretación de la reacción de reducción del ácido úrico al actuar éste como acceptor electrónico en la oxidación de la hipoxantina a xantina por medio de la xantindeshidrogenasa, y se ha tratado de investigar si la xantinoxidasa bovina exhibe análogas características.

La discutida posibilidad de dismutación de la xantina, ha sido estudiada con el enzima de ambas procedencias.

Se ha tratado, por último, de proponer un modelo cinético-matemático, que permita interpretar las desviaciones de la linealidad, que se presentan en el estudio cinético de los sistemas implicados.

3 MATERIALES Y METODOS
=====

3.1 MATERIALES

3.1.1 PREPARADOS ENZIMATICOS

Como fuente enzimática de xantinoxidasa y xantindeshidrogenasa se han utilizado preparados procedentes de hígado de buey y de pollo respectivamente. Los preparados se obtuvieron en todos los casos a partir de órganos frescos.

3.1.2 PREPARACION DE REACTIVOS

Los distintos productos, que se utilizaron en las experiencias, se disolvieron en tampón de fosfato sódico 0,05 M del pH requerido, o bien en el medio adecuado, ajustando el pH al final (pH metro). Las diversas disoluciones se prepararon inmediatamente antes de su utilización.

3.1.2.1 Sustratos

Hipoxantina (Merck), xantina (Merck), ácido úrico (Merck) y NADH (Boehringer).

Las disoluciones de hipoxantina, xantina y ácido úrico se prepararon disolviendo las sustancias con ayuda de unas gotas de NaOH 0,1 N, se ajustó al pH requerido mediante unas gotas de HCl 0,1 N, y se diluyó con el tampón necesario, según el pH deseado, al volumen final en matraz aforado.

Las disoluciones de NADH se efectuaron en el tampón adecuado, se ajustaron al pH por adición de NaOH 0,1 N y se diluyeron, en matraz aforado, con el mismo tampón.

3.1.2.2 Cofactores

NAD⁺ (Boehringer).

Las disoluciones de NAD⁺ se prepararon de forma análoga a la descrita para las disoluciones de NADH.

3.1.2.3 Otros reactivos

Ditiotreitón (Sigma), ditiocitritol (Sigma), p-cloromercu-ribenzoato (Fluka), 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (Calbiochem), N-etilmaleimida (Aldrich-Europe), iodoacetamida (Merck), 2-mercaptoetanol (Merck) y NaHSO₃ (Merck).

Las disoluciones de ditiotreitón, ditiocitritol y p-cloromercu-ribenzoato se prepararon con ayuda de unas gotas de NaOH 0,1 N, ajuste posterior al pH deseado y dilución al volumen final requerido con el tampón adecuado.

Las disoluciones de 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico), se prepararon en tampón de fosfato sódico 0,05 M de pH 8, óptimo para la actuación de este inhibidor. Estas disoluciones deben emplearse recién preparadas a fin de evitar la posible disociación del reactivo a pH alcalino.

Las disoluciones de 2-mercaptoetanol, iodoacetamida y N-etilmaleimida, se prepararon con tampón de fosfato sódico de pH 7,4 ajustándose a este pH en caso necesario.

Las disoluciones de NaHSO₃ se obtuvieron disolviendo el sólido en la mínima cantidad del tampón del pH requerido, ajuste de éste y posterior dilución con el mismo tampón en matraz aforado.

3.1.3 DISOLUCIONES TAMPON

3.1.3.1 Tampón Tris-fosfato sódico

Se preparó a partir de las disoluciones estandar de tris-(hidroximetil) aminometano (Merck) 0,1 M (12,1 g/l) y fosfato monosódico dihidratado (Merck) 0,1 M (15,6 g/l).

Por mezcla de los volúmenes necesarios de ambas disoluciones, se obtienen aquéllas cuyo pH se halla entre 5 y 9,5. Se adicionó KCl de forma que la concentración final de la sal en todas las disoluciones fuese 0,1 M ; la molaridad del tampón es 0,142, que se mantuvo constante.

3.1.3.1 Tampón fosfato sódico

El tampón de fosfato sódico 0,05 M, se obtiene al mezclar disoluciones de fosfato monosódico dihidratado (Merck) 0,2 M (31,2 g/l) y fosfato disódico dodecahidratado (Merck) 0,2 M (71,7 g/l) y dilución con agua bidestilada a la molaridad deseada.

Se han empleado las disoluciones de ~~pH~~ comprendidos entre 5,5 y 8 (82).

3.1.4 MATERIAL DE CROMATOGRAFIA

Las resinas cromatográficas utilizadas fueron de dos tipos, de intercambio iónico y de exclusión.

3.1.4.1 Resinas de intercambio iónico: DEAE-celulosa (Whatman)

40 g de la resina se suspenden en 500 ml de NaOH 0,1 M y se agi

ta durante 10 min. separándose finalmente por filtración en un Buchner. La operación se repite dos veces. Se lava a continuación con agua bidestilada hasta reacción neutra y se suspende la resina en 500 ml de HCL 0,1 N, efectuándose un tratamiento análogo al realizado anteriormente con el NaOH. Se lava nuevamente con agua bidestilada hasta reacción neutra y a continuación con tampón de fosfatos 0,2 M del pH al que se deba efectuar la elución, siguiendo tres lavados consecutivos con tampón de fosfatos 0,001 M del mismo pH. Al final del tratamiento la resina se encuentra equilibrada al pH requerido. Finalmente se suspende la resina en el mismo tampón, utilizando unos 50 ml de éste por cada gramo de resina.

Con la suspensión así obtenida se rellena la columna (2,5x50 cm) mediante adiciones frecuentes, dejando que el tampón fluya lentamente por la parte inferior de la columna y procurando que sobre la resina sedimentada queden siempre unos dos cm de tampón.

3.1.4.2 Resinas de exclusión: Sephadex G-200 (Pharmacia)

Se suspenden en agua bidestilada 20 g de resina Sephadex G-200, en la proporción de 40 ml por cada gramo. La mezcla se mantiene alternativamente en agitación y reposo durante 72 horas. Posteriormente se decanta eliminándose las partículas más ligeras y el conjunto se filtra en un Buchner. Se suspende el residuo en tampón de fosfatos 0,2 M del pH adecuado y se filtra al cabo de 15 min. de agitación mecánica. La operación se repite hasta que la resina alcanza el pH del tampón. A continuación se lava con tampón de fosfatos 0,05 M del mismo pH que el anterior repetidas veces y finalmente se llena la columna (3x70 cm) de forma análoga a la descrita para la de DEAE-celulosa.

MÉTODOS

3.2

DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

3.2.1

La determinación de las actividades enzimáticas se efectuó por lectura de las absorbancias en un espectrofotómetro PYE UNICAM 1700, provisto de un inscriptor AR 25, en cubetas de 1 cm de paso de luz, termostatadas a $30 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ y a diversas longitudes de onda.

Determinación de actividad xantinoxidásica

3.2.1.1

a)-En presencia de oxígeno.

La actividad de la xantinoxidasa se ha determinado con el oxígeno como aceptor electrónico, utilizando la xantina como sustrato. La medida de los incrementos de densidad óptica, se efectuó a 295 nm, longitud de onda a la que la diferencia entre los coeficientes de extinción molar de la xantina y del ácido úrico es mayor. La conversión de densidades ópticas en moles se efectuó de acuerdo con la fig. 1, en función del pH al que se hubiese efectuado ~~la~~determinación.

Cuando el sustrato utilizado fue la hipoxantina, las lecturas de densidad óptica se efectuaron a 279 nm que corresponde a un punto isobéptico de la xantina y del ácido úrico, el cual permite la determinación de variaciones de la concentración de hipoxantina sin que interfiera la desaparición de xantina. Para la correspondiente transformación de densidad óptica en moles se ha utilizado la fig. 1 de forma análoga al caso anterior.

b)-Incubación en anaerobiosis.

La actividad de la xantinoxidasa en anaerobiosis se midió en

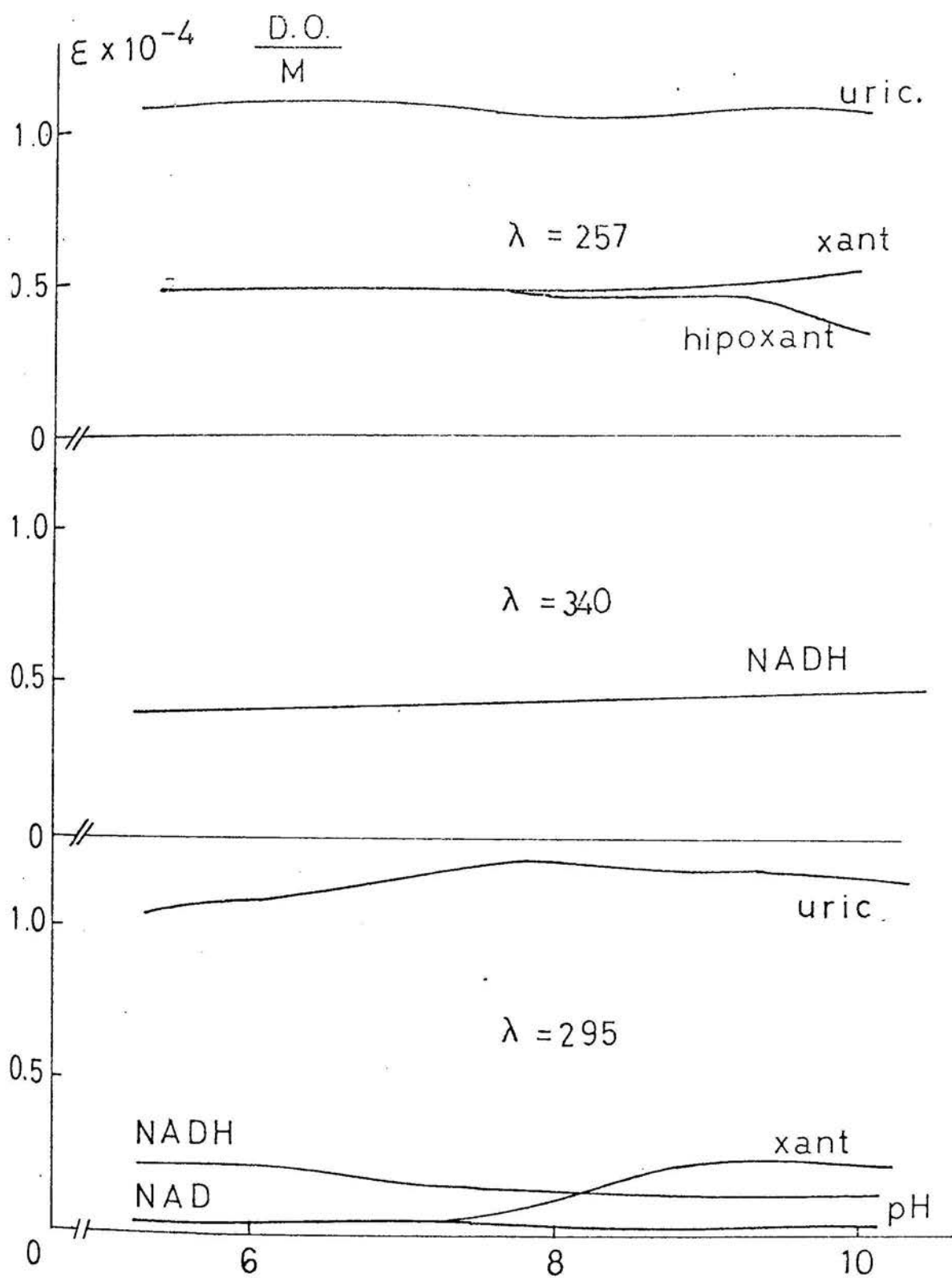


Fig. 1 Variación de $\bar{\epsilon}$ con el pH

mezclas que se incubaron en atmósfera de nitrógeno. Las mezclas en incubación se colocan en matraces de fondo redondo (250 ml) provistos de tubo abductor y de salida y se hace burbujear a su través una corriente de nitrógeno que ha atravesado previamente una disolución alcalina de pirogalol al 30% con objeto de eliminar el oxígeno residual acompañante. Una vez transcurrido el intervalo de la reacción, se interrumpe ésta por adición de ácido tricloroacético al 5%, en cantidad tal que su concentración final sea del 1%. Al cabo de 15 min. se separa el precipitado proteico por filtración. El filtrado obtenido se neutraliza y se lleva a pH 7,4 diluyéndose a continuación en matraz aforado hasta el volumen conveniente. En la disolución así obtenida se leen las absorbancias a 249, 260, 279 y 295 nm. Una vez determinados los coeficientes de extinción molar de la hipoxantina, la xantina, el ácido úrico y de la fracción peptídica que permanece en disolución, se puede determinar la concentración final de los cuatro productos una vez transcurrida la reacción y así determinar la actividad.

3.2.1.2 Determinación de actividad xantindehidrogenásica

a)-Aerobiosis.

La actividad de la xantindehidrogenasa con NAD^+ como aceptor electrónico en presencia de oxígeno, se determinó por lectura de los incrementos de densidad óptica a 340 nm. La conversión de incrementos de densidad óptica en su equivalente de concentración se efectuó de acuerdo con la fig. 1.

b)-Incubación en anaerobiosis

La actividad anaerobia de la xantindehidrogenasa se determinó de forma idéntica a la indicada para la actividad anaerobia de la xantinoxidasa, si bien las determinaciones de densidad óptica se efectuaron únicamente a 340 nm.

3.2.1.3 Determinación de la actividad diaforásica

La actividad diaforásica, tanto de la xantinaoxidasa como de la xantinahidrogenasa, se determinó por lectura a 340 nm de los incrementos de absorbancia debidos a la desaparición de NADH. La conversión de incrementos de densidad óptica en moles se efectuó de acuerdo con la fig. 1.

3.2.1.4 Determinación de la actividad uricásica

La actividad uricásica, a pH 8, se determinó por lectura a 295 nm de los decrementos de absorbancia provocados por la desaparición de ácido úrico. La conversión de descensos de absorbancia en los correspondientes moles de ácido úrico se efectuó por medio de la fig. 1.

3.2.1.5 Determinación de actividad proteolítica

La actividad ~~proteolítica~~ se determinó para las distintas muestras de tripsina, -quimotripsina y subtilisina. Se efectuó por lectura a 280 nm de los péptidos presentes en los ~~filtrados~~ ácidos obtenidos al interrumpir la acción proteolítica con ácido tricloroacético, tal como se describe en 3.2.1.1 b).

3.2.2 PURIFICACIÓN DE LA XANTINDESHIDROGENASA DE HIGADO DE POLLO

La xantinahidrogenasa de hígado de pollo se preparó según el método propuesto por GUBERT y col. (13).

El preparado parcialmente purificado es apto para la mayor parte de las experiencias. Se emplearon preparados purificados por

separación cromatográfica. La técnica cromatográfica se describe en 3.2.4.

La actividad específica del preparado parcialmente purificado es de 0,140 y una vez pasada por columna de cromatografía de DEAE-celulosa es de 0,4.

3.2.3 DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEICO

3.2.3.1 Método espectrofotométrico

El contenido proteico de las disoluciones, se estableció por medida de la absorción de las muestras a 280 nm, máximo de absorción de los restos aminoácidos aromáticos de las proteínas, e introduciendo el factor de conversión de la absorción a 260 nm, según el método descrito por WARGBURG y CHRISTIAN (83) (84).

3.2.3.2 Método de Lowry

La mezcla de los reactivos de Folin-Ciocalteay y de Biuret (85) reacciona con las proteínas y produce coloraciones que pueden leerse a 500 ó 750 nm (86), según sea la concentración de proteína en el medio.

Para la determinación de proteína es preciso disponer de la correspondiente curva de calibrado. La fig. 2 corresponde a la curva obtenida a partir de la disolución de seroalbúmina en agua bidestilada, la cual ha sido empleada en las experiencias que se describen.

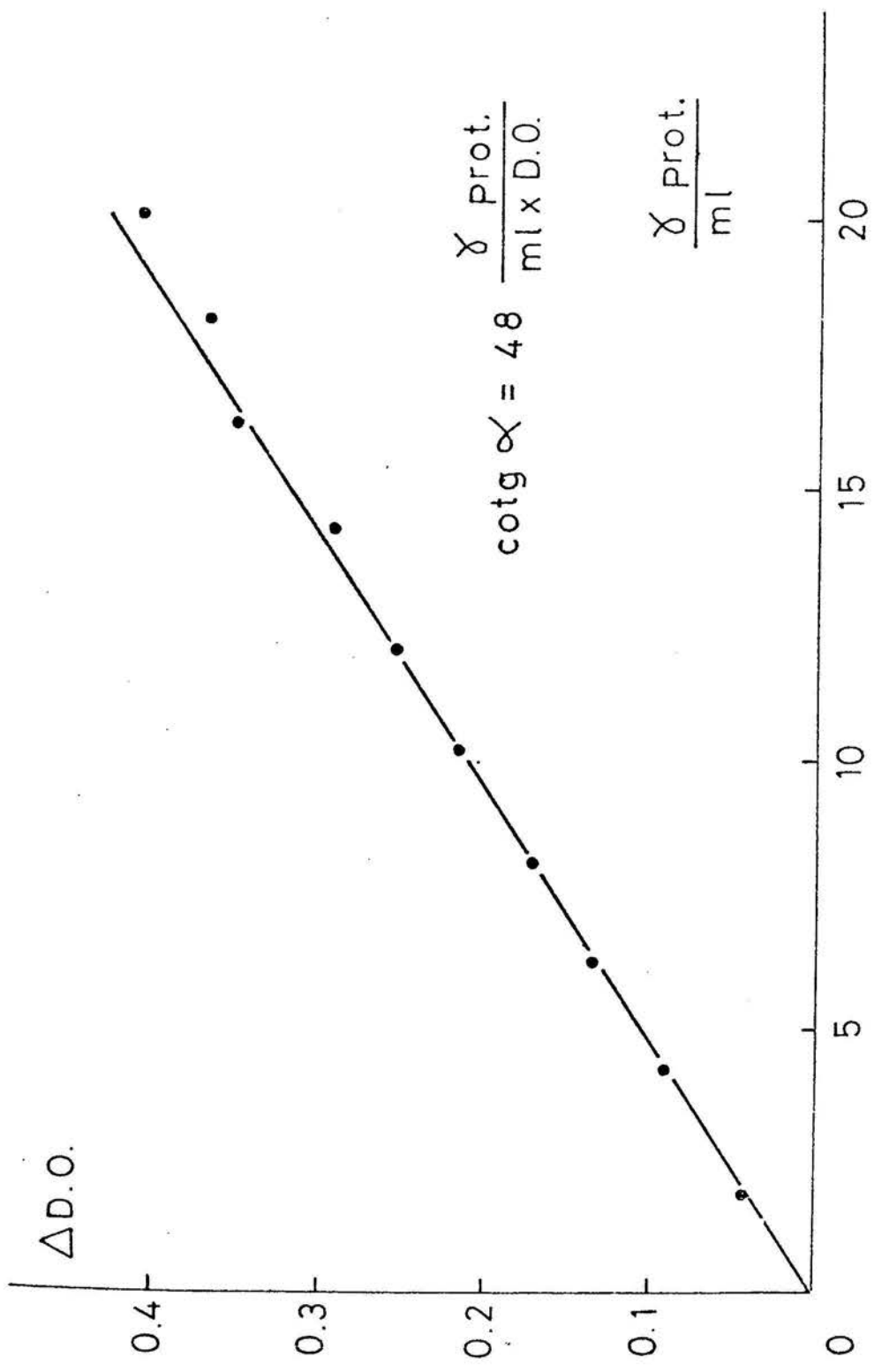


Fig. 2 Curva estandar de seroproteína ($\lambda = 750 \text{ nm}$)

3.2.4 TECNICAS CROMATOGRAFICAS

Los preparados de xantindeshidrogenasa de hígado de pollo ó de xantinoxidasa de hígado de buey a cromatografiar se dializan previamente para eliminar las sales acompañantes, cuando la resina es de intercambio iónico. La mezcla que se somete a cromatografía contiene unos 4 g del preparado disuelto en 10 ml y se adicional cuidadosamente a la columna cromatográfica.

Cuando se trata de resinas de intercambio iónico DEAE-celulosa, la elución se inicia con tampón de fosfatos 0,001 M, siendo la velocidad a la que se recogen las fracciones de 0,5 ml por min.; una vez se observa que las fracciones recogidas no contienen proteína, se continúa la elución mediante un gradiente formado por 400 ml de tampón de fosfatos 0,001 M y 200 ml de tampón de fosfatos 0,1 M, todos ellos de pH 7,4.

Cuando la resina utilizada fue de exclusión Sephadex G-200, la elución se efectuó mediante tampón de fosfatos 0,05 M de pH 7,4 y a la misma velocidad que en el caso descrito anteriormente. Todas las operaciones se efectuaron a 42C.

3.2.5 DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE GRUPOS SULFIDRILLO CON p-CLOROMERCURIBENZOATO

Los grupos sulfhidrilo forman mercáptidos con el p-cloromercuri benzoato (PCMB), se observa entonces, que el espectro del reactivo experimenta un considerable incremento en la región visible que es proporcional a la concentración del mercáptido formado.

Para su determinación se ha empleado la técnica desarrollada por BOYER (87).

La formación del mercáptido va acompañada de un incremento de absorción del PCMB a 250 nm ($=1,69 \times 10^4$ UDO/M; pH=7,4), el cual presenta un máximo de absorción entre 250 y 255 nm. A dicha longitud de onda en el espectro de las proteínas aparece generalmente un mínimo de absorción.

La determinación de los grupos sulfhidrilo presentes en la xantinoxidasa y la xantindeshidrogenasa se llevó a cabo poniendo en contacto muestras que contenían concentraciones variables del enzima en presencia de una concentración constante de PCMB (1×10^{-5} M). Como blanco se utilizaron muestras enzimáticas de idéntica concentración. Se efectuaron lecturas a diversos intervalos de tiempo hasta observar que la densidad óptica se mantenía constante. La velocidad de formación del mercáptido varía con la naturaleza del compuesto sulfhidrilo implicado. Se debe determinar en primer lugar el intervalo de tiempo necesario para la formación del compuesto.

El valor de densidad óptica se obtiene después de sustraer el valor hallado, la densidad óptica correspondiente a la disolución de PCMB 1×10^{-5} M, a la misma longitud de onda.

Al representar valores de densidad óptica obtenidos para las distintas concentraciones molares del enzima, se obtienen incrementos de densidad óptica a medida que aumenta la concentración enzimática, hasta que finalmente se alcanza una constancia en el valor de la absorción, lo que significa que todo el PCMB ha reaccionado con los grupos sulfhidrilo del enzima. El punto de inflexión mostrará la cantidad del enzima que ha reaccionado con la concentración del PCMB utilizada. Así la cantidad de grupos valables presentes se obtendrá mediante la relación:

$$\frac{[\text{PCMB}]}{[\text{ENZIMA}]} = \frac{\text{GRUPOS SH}}{\text{MOL ENZIMA}}$$

3.2.6

EXPRESION DE LOS PARAMETROS CINETICOS

3.2.6.1

Cálculo de los parámetros cinéticos

El cálculo de los parámetros cinéticos se basa en la ecuación propuesta por MICHAELIS (88) y por ALBERTY (89) partiendo de distintas hipótesis.

La representación gráfica de los valores experimentales se ha efectuado mediante la representación de la ecuación propuesta por LINEWEAVER-BURCK (90)

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$

en la que al representar $1/v$ frente a $1/S$ se obtiene una recta y por extrapolación es posible hallar los valores de K_M y $V_{\text{máx}}$. En esta representación se produce una distribución desigual de puntos correspondientes a diversas concentraciones de sustrato, quedando los de concentraciones bajas muy distanciados con respecto a las mayores, que, a su vez, se agrupan junto al eje de ordenadas.

En la ecuación propuesta por EADIE-HOFSTEE (91) (92)

$$\frac{v}{S} = \frac{V_{\text{máx}}}{K_M} - \frac{v}{K_M}$$

al representar v/S frente a v se obtienen también los parámetros cinéticos. Esta representación resulta ventajosa sobre la anterior ya que presenta una distribución más amplia, y facilita así el trazado de la recta ; permite observar si un punto es incorrecto, ya que las desviaciones de la linealidad se perciben más acusadamente.

La tercera forma es la propuesta por HANES (93) correspondiendo a la ecuación

$$\frac{S}{v} = \frac{S}{V_{\text{máx}}} + \frac{K_M}{V_{\text{máx}}}$$

en la que al representar S/v frente a S ocurre lo contrario que en la representación de Lineweaver-Burck, quedan agrupados los puntos que corresponden a las concentraciones bajas y se separan al aumentar aquéllas. Tiene la ventaja de que los cálculos de las velocidades iniciales para concentraciones de sustrato bajas son generalmente más imprecisos que los correspondientes a concentraciones elevadas, y al agruparlos resulta más precisa la recta así obtenida.

3.2.6.2 Determinación de las constantes cinéticas reales

Los valores de las velocidades máximas y de las constantes de Michaelis en sistemas multisustrato dependen, en general, de la concentración de los demás sustratos (94) (95), es preciso por tanto utilizar un método de representación adecuado, para calcular los parámetros cinéticos reales de la forma más precisa posible. Se ha utilizado, el método propuesto por VESTLING-FLOORINI (96), basado en el desarrollo de la ecuación propuesta por ALBERTY (89). Para efectuar las representaciones secundarias se pueden emplear los parámetros obtenidos por cualquiera de los métodos gráficos descritos en el apartado anterior.

3.2.6.3 Cinética de inhibición

En la formulación del mecanismo cinético de un sistema enzimático, es fundamental establecer el comportamiento del enzima frente a concentraciones elevadas de los sustratos y de los productos, capaces de provocar inhibición.

a)-Inhibición ~~por~~ producto

El tipo de inhibición provocado por los productos de la reacción y el cálculo de los parámetros cinéticos, se ha efectuado por aplicación de los métodos gráficos ya descritos (véase 3.2.6.1)

Los tres tipos de inhibición puros son: competitiva (C), no competitiva (NC) y acompetitiva (AC). La representación gráfica por cualquiera de los métodos mencionados permite su definición.

DEFINICION GRAFICA DEL TIPO DE INHIBICION

TIPO INHIBICION	METODO DE REPRESENTACION GRAFICA		
	Lineweaver-Burck	Eadie-Hofstee	Hanes
C	Intersec. rectas eje ordenadas	Intersec. rectas eje abscisas	Rectas paralelas
NC	Intersec. rectas eje abscisas	Rectas paralelas	Intersec. rectas eje abscisas
AC	Rectas paralelas	Intersec. rectas eje ordenadas	Intersec. rectas eje ordenadas

Aparecen, además, tipos de inhibición que no corresponden de un modo definido a ninguno de los tipos puros ; son tipos de inhibición que resultarían de la mezcla de aquéllos y en los cuales predomina con frecuencia, uno de ellos, tal como ponen de manifiesto las representaciones gráficas.

En el estudio de la inhibición por los productos de la reacción, es necesario determinar el carácter de la inhibición cuando la concentración de sustrato es ó no cinéticamente saturante. La presencia de un sustrato saturante crea una irreversibilidad en la secuencia reaccional, lo que implica, según las predicciones teóricas de CLELAND (67) (97), un cambio en el carácter de las inhibiciones que resulten afectadas.

Las representaciones secundarias de las pendientes y de las intersecciones de las rectas en que se ha producido inhibición y del correspondiente control, frente a las distintas concentraciones del producto inhibidor, proporcionan distintas representaciones que permiten establecer el comportamiento lineal, parabólico, hiperbólico ó incluso más complejo de la inhibición. Las desviaciones de la linealidad son debidas a la existencia de inhibidores capaces de fijarse a diferentes formas del enzima. Así, cuando el inhibidor se fija a dos formas distintas del enzima, los efectos que produce sobre el valor de la pendiente o de la intersección, se pueden sumar ó multiplicar lo que depende de las formas enzimáticas a las que se fija el producto inhibidor. Si éstas se hallan relacionadas a través de pasos reversibles entre sí, con anterioridad a la fijación del producto inhibidor, se multiplican los efectos, pero si existe irreversibilidad entre ambas formas enzimáticas los efectos se suman. Es importante destacar que el sustrato variable crea una etapa irreversible, cuya existencia se refleja en la intersección y esto es la adición del sustrato considerado como variable en la secuencia de reacción, crea una etapa irreversible a concentración saturante, lo cual se refleja en las intersecciones de la representación de Lineweaver-Burck. El que los efectos producidos por el inhibidor sean aditivos no provocará ninguna desviación de la linealidad, pero si se multiplican, las curvas que se obtienen en la representación secundaria resultarán de tipo parabólico (97) (98).

La aparición de curvas de tipo hiperbólico en la representación secundaria, conduce a la hipótesis de la existencia de mecanismos más complejos en los que la fijación de los productos y la de los sustratos se realiza al azar, ó bien a suponer que las formas enzimáticas a las que se fija el producto inhibidor son capaces de transformarse con una velocidad definida.

A partir de las representaciones secundarias, es posible determinar la constante de inhibición mediante la intersección de la curva con el eje de abscisas.

b)-Inhibición por sustrato

El conocimiento del tipo de inhibición producida por exceso de sustrato, puede ser un valioso auxiliar para el conocimiento del mecanismo de la reacción enzimática. En el curso de este trabajo se ha procedido a determinar su existencia y el carácter de la misma cuando ha sido posible.

En los casos más simples de inhibición por sustrato, se ha aplicado la ecuación de Michaelis, interiniendo el factor de inhibición, en forma análoga a la ecuación de Lineweaver-Burck.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} + \frac{K_i}{V_{\text{máx}}} S$$

La representación gráfica de $1/v$ frente a $1/S$ o frente a S conduce, en ambos casos, a una hipérbola en la que su asíntota inclinada permite calcular el valor de los distintos parámetros. Cuando se representa $1/v$ frente a $1/S$, el valor obtenido a partir de la intersección de la asíntota oblicua con el eje de abscisas permite hallar el valor de K_M . Sin embargo, cuando se representa frente a S la citada intersección conduce a la obtención del valor de K_i correspondiente a la disociación del complejo o forma enzimática que contiene la molécula del sustrato causante de la inhibición (94) (99). En ambas representaciones la intersección de la asíntota oblicua con el eje de ordenadas conduce a obtener el valor de la inversa de la velocidad máxima.

Cuando el mecanismo es sencillo sirve de comprobación el hecho de que, la concentración de sustrato que corresponde al mínimo de ambas representaciones, es igual a la raíz cuadrada del cociente entre K_M y la constante de formación del complejo enzimático con la molécula de sustrato causante de la inhibición.

Para establecer el carácter de la inhibición ejercida por exceso de sustrato con respecto al otro sustrato, se efectúan expe-

ciencias en las que se mantiene constante la concentración de sustrato inhibidor frente a diversas concentraciones del otro sustrato que se considera variable. El tratamiento matemático es idéntico al propuesto para la inhibición por producto.

3.2.6.4 Mecanismos cinéticos

La interpretación del mecanismo de reacción al que se ajusta el comportamiento de la xantinaoxidadasa y la xantina deshidrogenasa, se ha efectuado por aplicación de las normas teóricas de CLELAND (67) (97) (100) y la interpretación en cada caso concreto se efectúa en la parte experimental.

3.2.6.5 Variación de los parámetros cinéticos con el pH

El efecto del pH sobre la actividad enzimática es debido a las variaciones del estado de ionización de los componentes del sistema enzimático con el pH. Los cambios son atribuibles tanto al enzima libre, como al complejo enzima-sustrato o al sustrato.

Si el enzima es una proteína que contiene muchos grupos ionizables, existen varios estados de ionización distintos y la distribución total del enzima entre las distintas formas iónicas depende del pH y del valor de las constantes de ionización de los distintos grupos ionizables.

Por otra parte, como el máximo de la actividad catalítica se encuentra en una pequeña región del pH, parece probable que unas formas iónicas determinadas sean las enzimáticamente más activas. Se puede esperar, por tanto, que la ionización de los grupos de la proteína alejados del centro activo, influya poco sobre la actividad enzimática, mientras que los grupos ionizables situados en sus proximidades, o bien en el propio centro, pueden causar efectos considerables en la velocidad de catálisis y en la afinidad por el sustrato de la reacción.

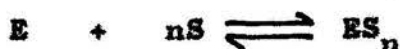
En el presente estudio, se ha aplicado el método de DIXON (101) (102) quien, teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente mencionadas, formuló las ecuaciones de variación de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ con el pH. Las representaciones de pK_M y $\log V_{m\acute{a}x}$ frente al pH permiten obtener una curva para cada enzima y cada sustrato; los puntos de inflexión corresponden a los valores de pK de los grupos ionizables del enzima, de los sustratos, ó bien, del complejo enzima-sustrato, que afectan al centro catalítico del enzima o a la unión del enzima y sus sustratos.

3.2.6 Cinética de alosterismo

Algunas desviaciones observadas al emplear las representaciones anteriormente citadas (3.2.1) para la obtención de los parámetros cinéticos y conocer el modo de actuación de los enzimas de los que se ocupa el presente trabajo, aconsejaron la utilización de distintas ecuaciones que podían facilitar su interpretación.

La ecuación de HILL (103) es una de las empleadas para interpretar el comportamiento de los enzimas alostéricos. En su representación gráfica las ordenadas corresponden a los valores de $\log v/V_{m\acute{a}x} - v$ y las abscisas a los de $\log S$.

Se pueden obtener los valores de n y K ; n corresponde al denominado coeficiente de Hill, que representa el grado de cooperatividad (o el número de subunidades mínimas de que consta el enzima cuando el valor de este coeficiente excede de la unidad) y K , corresponde al valor de la constante de equilibrio del sistema.



En los sistemas no alostéricos K coincide con la constante de Michaelis y probablemente el parámetro n se adapta a la unidad.

La representación de Michaelis de v frente a S (88) es habitualmente una hipérbola, pero en la mayoría de los enzimas alostéricos, cuando la cooperatividad es positiva (coeficiente de Hill superior a la unidad) se transforma en una sigmoide.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO
=====

XANTINOXIDASA DE HIGADO DE BUEY	XO
XANTINDESHIDROGENASA DE HIGADO DE POLLO	XDH
P-CLOROMERCURIBENZOATO	PCMB
2-MERCAPTOETANOL	2-ME
N-ETILMALEIMIDA	NEM
IODOCETAMIDA	IAM
5,5'-DITIOBIS-(2-ACIDO NITROBENZOICO)	DTND
DITIOERITOL	DTT
DITIOERITRITOL	DTE

4

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 PURIFICACION DE LA XANTINOXIDASA HEPATICA DE BUEY

La purificación de la XO no se halla descrita en la bibliografía. El método de purificación de la XO que se describe más adelante, se basa en los propuestos por REMY y col. (11), modificado posteriormente por CARRASCO y col (104) (105) y por GUBERT y col. (13) para la obtención de la XDH. Se basan los citados métodos en la obtención de homogeneizados de tejido hepático, en tampón de fosfatos, mediante trituración mecánica y calefacción de la mezcla a 56°C durante 30 min. para provocar la rápida desnaturalización de las proteínas termolábiles. A continuación sigue un enfriamiento rápido para evitar la progresión del proceso de desnaturalización afecte a la XDH. Con el tratamiento térmico, se consigue un rápido incremento de la actividad específica. El residuo proteico sólido procedente de la desnaturalización térmica se elimina por centrifugación y el sobrenadante se fracciona con sulfato amónico, recogándose el precipitado que se obtiene entre el 35 y 60% de saturación en la sal. El precipitado sólido que posee la actividad xantindehidrogenásica, se somete a una separación cromatográfica en columna. Se utiliza una resina de intercambio iónico DEAE-celulosa, y mediante la aplicación de un gradiente se obtiene la XDH exenta prácticamente de lactato deshidrogenasa y cuya actividad específica es elevada con respecto al tejido de partida.

4.1.1

PREPARACION DE LOS HOMOGENEIZADOS

Se ha trabajado en todos los casos con hígado de buey obtenido en el matadero local, procedente de animales recién sacrificados. El tejido contiene uricasa, enzima que cataliza la trans-

formación de ácido úrico en alantoina, su presencia interferiría en las determinaciones del ácido úrico producido en la reacción de la XO. Se ha procedido por dicha razón, a la obtención de homogeneizados del tejido hepático, en disolución de sacarosa 0,25 M en un triturador de Potter-Elvehjem. Con objeto de conseguir una mejor homogeneización en sacarosa, se procedió a triturar previamente el tejido hepático, mediante un triturador de cuchillas.

4.1.1.1 Proporción óptima hígado/sacarosa en los homogeneizados

Se ha efectuado el estudio de la proporción de disolución de sacarosa 0,25 M por gramo de tejido hepático, con la que se obtiene una mayor actividad específica. Con este objeto, se preparan tres homogeneizados en los que el volumen de disolución de sacarosa por gramo de hígado es de 4, 7 y 9 ml, y cuyas proporciones son 1/5, 1/8 y 1/10 respectivamente. Las suspensiones se centrifugan a 2.500xg durante 10 min. para eliminar el residuo sólido.

Los mejores resultados se obtienen por homogeneización de 1 g de tejido hepático y 7 ml de sacarosa 0,25 M, proporción que se adoptó en sucesivas experiencias (Tabla I).

T A B L A I

ACTIVIDAD XO DE LOS HOMOGENEIZADOS DE HIGADO DE BUEY

g tejido/ml	Volumen (ml)	U/ml	U_t	mgP/ml	A.E.
1/5	520	3,17	1.650	17,78	0,178
1/8	830	2,20	1.830	11,48	0,192
1/10	1.050	1,82	1.910	9,52	0,191

168 g de tejido hepático homogeneizados con 1.176 ml de sacarosa 0,25 M ; volumen total de 1.300 ml (H_2O).

4.1.1.2 Determinación de la proteína total en el hígado de buey

El contenido total de la proteína en el hígado de partida, se determina a partir de 20 ml del homogeneizado (1/8) ; se suspenden en 480 ml de tampón de fosfato sódico 0,1 M de pH 7,4, y se mantiene el conjunto en agitación durante 3 h. Se consigue con ello la ruptura de todas las membranas y la liberación de toda la proteína existente en la fracción del homogeneizado, tomada como referencia. Transcurrido el citado intervalo, se centrifuga el homogeneizado a 1500xg, durante 15 min., para eliminar el residuo insoluble.

En el sobrenadante claro, se determina la proteína presente mediante los métodos de Lowry (86) y de Wargbur y Christian (83) (84).

4.1.2 ELIMINACION DE MITOCONDRIAS PESADAS Y LIGERAS

La eliminación de mitocondrias pesadas y ligeras y de sus acompañantes, se efectúa por centrifugación del homogeneizado (1/8) anteriormente mencionado a 15.000xg durante 1 h a 4°C en una centrífuga refrigerada J-21 Beckman. La centrifugación permite la eliminación total de la actividad uricásica.

El sobrenadante obtenido en la centrifugación (S_1) posee coloración rojo pardo. Los valores de actividad xantinoxidásica obtenidos son los que se muestran en la tabla II.

T A B L A I I
ACTIVIDAD XO DE LAS FRACCIONES

Muestra	Volumen (ml)	U/ml	U_t	mgP/ml	A.E.	G.P.
H_0	1.300	2,40	3.120	28,79	0,083	-
S_1	1.143	2,58	2.950	15,73	0,164	1,98

4.1.3 PRECIPITACION TERMICA DE LAS PROTEINAS TERMOLABILES

El tratamiento térmico de los homogeneizados de hígado de diversos animales, en la preparación de XO ~~de~~ XDH, permite la eliminación de las proteínas termolábiles y se revela como muy conveniente.

Se ha procedido aquí a estudiar el intervalo de tiempo a que debe someterse el sobrenadante (S_1) a la temperatura de 56°C.

El homogeneizado se calentó a esta temperatura, en lugar de hacerlo por adición de tampón caliente (13), tal como se efectuaba en la preparación de la XDH.

Volúmenes iguales del sobrenadante (S_1) se calientan con agitación constante, en un baño de agua a la temperatura de ebullición, hasta alcanzar los 56°C, para ello bastan de 9 a 10 min. Se mantienen las muestras en el termostato a dicha temperatura durante intervalos de tiempo comprendidos entre 15 y 45 min.

Transcurrido el intervalo de tiempo previsto, se enfrían rápidamente las muestras a 4°C por inmersión en una mezcla frigorífica de hielo y sal.

Las diversas muestras se centrifugan a 3.000xg, 15 min. a 4°C. Se descartan los precipitados proteicos, que son inactivos, y se determina la actividad XO en los distintos sobrenadantes.

Los resultados obtenidos aparecen expresados en la tabla III.

T A B L A III

INFLUENCIA DEL INTERVALO DE CALEFACCION SOBRE LA
ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA XO

Intervalo (min.)	Volumen (ml)	U/ml	U _t	mgP/ml	A.E.
15	240	2,11	560	4,37	0,482
25	227	2,40	541	4,22	0,563
30	215	2,51	540	4,40	0,570
35	200	2,61	521	4,65	0,561
45	188	2,12	400	4,44	0,480

El intervalo de tiempo de calefacción más favorable es el de 30 min., con el que se consigue la máxima eliminación de proteína y la actividad se mantiene alta. Al prolongar la calefacción se elimina gran cantidad de proteína, pero la pérdida de actividad es muy notable.

De acuerdo con estos resultados, se adoptó la práctica de calefacción de los homogeneizados durante 30 min. como una de las etapas del proceso de purificación.

4.1.3.1 Coagulación del precipitado

Los precipitados proteícos obtenidos después del tratamiento térmico, sedimentan con dificultad, aún sometidos a centrifugación, por lo que su decantación resulta difícil.

Con objeto de solucionar esta dificultad, se creyó adecuado el adicionar con anterioridad al tratamiento térmico, también de fosfato sódico al homogeneizado, con ello, además de mantener el pH y eliminar el riesgo de pérdida de actividad irreversible por variación de éste, se eleva la fuerza iónica de la disolución, fa-

voraciéndose la coagulación del precipitado y se facilita la separación por centrifugación.

Diversas experiencias muestran que la cantidad más idónea, es la adición de 1 ml de tampón de fosfato sódico 0,5 M de pH 7,4 por cada 9 ml de sobrenadante (S_1), con lo que la disolución queda con una concentración 0,05 M en fosfato sódico. Los resultados aparecen en la tabla IV.

T A B L A IV

ACTIVIDAD XO DEL SOBRENADANTE OBTENIDO DES-
PUES DEL TRATAMIENTO TÉRMICO

Muestra	Volumen (ml)	U/ml	U_t	mgP/ml	A.E.	G.P.
S_1	1.143	2,58	2.950	15,73	0,164	1,98
S_{1t}	1.270	2,31	2.933	13,15	0,170	1,99
S_2	1.120	2,40	2.680	4,90	0,579	6,44

A 1.143 ml de sobrenadante (S_1) se les añaden 127 ml de tampón de fosfato sódico 0,5 M de pH 7,4 ; el nuevo sobrenadante (S_{1t}) se somete al tratamiento térmico, tal como se indica en el apartado anterior y se recoge un nuevo sobrenadante (S_2).

4.1.4 FRACCIONAMIENTO SALINO DE LOS HOMOGENEIZADOS

Se estudia a continuación la aplicación de las técnicas de fraccionamiento salino, por adición de sulfato amónico y su adaptación al proceso de purificación de la XO.

4.1.4.1 Establecimiento del límite mínimo de $(NH_4)_2SO_4$ necesario para precipitar totalmente la XO

El margen de concentraciones de sulfatoamónico entre las que se

consigue la separación del precipitado activo se estableció de-terminando las condiciones más adecuadas para conseguir que el rendimiento y el grado de purificación fueran lo más elevados posibles.

Se tomaron muestras de 25 ml del sobrenadante obtenido en la desnaturalización térmica, y se llevaron a grados de saturación en sulfato amónico comprendidos entre el 40 y el 80%. La adición del sulfato amónico sólido se efectúa muy lentamente y con agitación constante. Terminada la adición de sal se prolonga la agitación durante 1 h y después de 8 h en reposo, a fin de asegurar una precipitación completa, se separa el precipitado por cen-trifugación a 5.000xg, 30 min., a 40C. A continuación se deter-mina la actividad XO de los precipitados y de los sobrenadantes en todas las muestras. Los resultados se recogen en la tabla V.

T A B L A V

ACTIVIDAD XO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS CON
(NH₄)₂SO₄ DESPUES DEL TRATAMIENTO TERMICO

% Saturación (NH ₄) ₂ SO ₄	Residuo (g)	Sobrenad. (ml)	U g p ml	U _t	mgP g o ml	A.E.
40	1,35		17,64	15,7	29,14	0,605
40		26,50	0,913	24,2	1,35	0,493
50	1,48		16,08	23,8	25,06	0,641
50		27,80	0,593	16,5	1,36	0,320
60	1,35		19,40	35,9	19,67	0,986
60		26,50	0,124	3,3	1,97	0,062
65	2,50		15,94	39,87	16,01	0,995
65		29,00	0,053	1,54	1,68	0,031
70	2,70		15,0	40,5	18,22	0,823
70		28,50	0,0	0,0	1,45	-
80	3,20		11,87	38,0	19,15	0,619
80		29,00	0,0	0,0	0,994	-

Puede apreciarse que cuando la saturación en sulfato amónico es del 40% la mayor parte de la xantinoxidasa, se halla en el sobrenadante, mientras que cuando se alcanza el 70% de saturación la actividad xantinoxidásica del sobrenadante es nula.

Cuando el grado de saturación en sulfato amónico es del 65% (43g/100 ml) se observa que prácticamente toda la xantinoxidasa se encuentra en el residuo sólido y que la actividad específica de éste es la máxima.

4.1.4.2 Precipitación con sulfato amónico al 65% de saturación

El sobrenadante obtenido en la precipitación térmica, se lleva al 65% de saturación en sulfato amónico, mediante la adición de 43 g de sulfato amónico sólido por cada 100 ml de disolución. Finalizada la adición se mantiene la suspensión con suave agitación durante 1 h, transcurrida la cual se deja en reposo durante 8 h más a 42C y se ajusta el pH a 7,4. Finalizado el intervalo de tiempo se procede a centrifugar la suspensión durante 30 min. a 5.000xg a 42C y se separa el precipitado activo (R₃).

4.1.4.3 Estudio del límite de sulfato amónico necesario para precipitar proteínas acompañantes de la XO

Se disuelve el precipitado obtenido al alcanzar el 65% de saturación en sulfato amónico, en la proporción de 1 g de precipitado húmedo en 5 ml de tampón de fosfato sódico 0,05 M de pH 7,4.

A cinco porciones de 25 ml de la disolución así obtenida, se les añaden 5, 8, 11, 14 y 17 g de sulfato amónico/100 ml, respectivamente; se ajusta el pH y se dejan en agitación durante 1 h y en reposo durante 8 h más. Al final del intervalo se centrifugan las muestras durante 30 min a 5.000xg y 42C y se determinan las actividades de los precipitados y de los sobrenadantes. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla VI.

T A B L A VI

ACTIVIDAD XO DE LOS DISTINTOS SOBRENADANTES
PRECIPITACION DE PROTEINAS IMPURIFICANTES

Concentración g (NH ₄) ₂ SO ₄ /100ml	Volumen (ml)	U/ml	U _t	mgP/ml	A.E.
5	27	15,37	415,2	7,45	2,06
8	26,5	15,30	405,6	7,38	2,08
11	27,5	14,62	402,1	6,65	2,19
14	27	14,82	400,35	6,52	2,27
17	26	14,04	365,0	6,67	2,10

Como puede observarse, la XO empieza a precipitar a partir de 14 g de sulfato amónico/100 ml de disolución, siendo pues esta cantidad la óptima para eliminar por precipitación la proteína acompañante exenta de XO.

Se procedió, de acuerdo con estos resultados, a efectuar la precipitación salina de las proteínas acompañantes obteniéndose un sobrenadante activo (S₄) con las características que pueden observarse en la tabla VII.

T A B L A VII

ACTIVIDAD XO DESPUES DE LA PRECIPITACION DE LAS
PROTEINAS IMPURIFICANTES

Muestra	Volumen (ml)	U/ml	U _t	mgP/ml	A.E.	G.P.
S ₂	1.120	2,4	2.680	4,49	0,579	6,44
R _{3d}	142	16,02	2.275	15,96	1,01	12,96
S ₄	142	16,02	2.275	7,05	2,27	27,38

4.1.4.4 Reprecipitación de la XO con sulfato amónico

Con el sobrenadante S_4 , se efectúan diversas experiencias, con el fin de averiguar la cantidad de sulfato amónico necesaria para precipitar del modo más completo la XO.

Se toman para ello, 4 muestras de 25 ml cada una del mencionado sobrenadante, a las que se añaden 31, 35, 39 y 43 g de sulfato amónico por cada 100 ml de disolución, respectivamente. Una vez añadida la sal, se dejan en agitación, después en reposo y finalmente se centrifugan en la forma acostumbrada. Los resultados se expresan en la tabla VIII.

T A B L A VIII

ACTIVIDAD XO DE LOS PRECIPITADOS CON $(NH_4)_2SO_4$

Concentración g $(NH_4)_2SO_4$	Peso (g)	U/g	U_t	mgP/g	A.E.
31	5	30,12	150,6	93,37	3,10
35	5,5	36,45	200,5	118,46	3,25
39	5,7	35,71	203,6	106,10	2,97
43	6,1	33,60	205,0	95,02	2,84

Puede pues observarse, que la concentración adecuada para conseguir un máximo de precipitación enzimática es de 35 g de sulfato amónico por cada 100 ml de sobrenadante (S_4).

Se procedió de acuerdo con estos resultados a efectuar la precipitación completa de la XO, obteniéndose un residuo activo (R_5) cuyas características pueden observarse en la tabla IX.

T A B L A IX

ACTIVIDAD XO DE LAS ETAPAS DE OBTENCION
DEL PURIFICADO PARCIAL

Muestra	Volumen (peso) (ml) (g)	U/ml(g)	U _t	mgP/ml(g)	A.E. G.P.
H ₀	1.300	2,4	3.120	28,79	0,083 -
S ₂	1.120	2,4	2.688	4,49	0,509 0,44
R ₃	142	16,02	2.275	15,96	1,01 12,96
R ₅	7,4	290,47	2.162	87,16	3,33 40,15

A partir de 142 ml de sobrenadante (S₄) se procedió a precipitar con 35 g de sulfato amónico por cada 100 ml de sobrenadante; se recogen por centrifugación 7,4 g de residuo activo (R₅), el cual poseía 40,15 veces la actividad del tejido hepático de partida ; con un rendimiento en el proceso del 69,3%.

4.1.5 SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS

Se describen a continuación los métodos cromatográficos empleados en el proceso de purificación de la XO, con el fin de obtener un preparado de elevado grado de pureza.

4.1.5.1 Cromatografía con DEAE-celulosa

En primer lugar se procedió a utilizar una columna confeccionada con la resina de intercambio iónico, DEAE-celulosa, según la bibliografía (13), se muestra adecuada para separar la XDH de la lactatodeshidrogenasa y de otras proteínas impurificantes.

Se parte de 4 g del purificado parcial, obtenido según las técnicas descritas anteriormente, una vez disueltos en la mínima

cantidad de tampón de fosfato sódico 0,001 M de pH 7,4 se diali-
zan durante 12 h. a 4°C frente al mismo tampón en presencia de
carbón activo en suspensión. Después de la diálisis se centrifuga
la muestra durante 10 min. a 4°C y 4.000xg, con lo que se se-
para el precipitado de la proteína amorfa. El sobrenadante obte-
nido se pasa a través de la correspondiente columna. La elución
se efectúa con tampón de fosfato sódico 0,001 M de pH 7,4 ; los
eluidos se recogen a una velocidad aproximada de 0,5 ml/min.,
en fracciones de 10 ml. Cuando se determina que los eluidos car-
recen de proteína, se establece un gradiente, consistente en
400 ml de tampón de fosfato sódico 0,001 M sobre el que se vier-
ten 200 ml del mismo tampón de concentración 0,1 M.

Los eluidos de la columna se recogieron en un colector automáti-
co FRACTOMAT, siendo efectuadas las operaciones a 4°C.

Los resultados aparecen en la fig. 3, en la que puede observarse
que los eluidos que contienen prácticamente toda la actividad
xantinoxidásica, se encuentran entre las fracciones 60 y 80.

Los eluidos activos se llevan al 65% de saturación en sulfato
amónico, según la técnica habitual. El precipitado se separa
por centrifugación ; su actividad es cuatro veces mayor que la
de la muestra de partida (R_5), por lo que se consideró la sepa-
ración cromatográfica adecuada para el proceso de purificación.

4.1.522 Cromatografía con Sephadex G-200

Para conseguir un mayor grado de purificación se utilizó, a con-
tinuación, una columna cromatográfica de Sephadex G-200, que es
una resina de exclusión capaz de retener las proteínas de peso
molecular inferior a 200.000. Como el peso molecular de la X₀ es
cila alrededor de 300.000, no quedará retenida por la resina,
mientras que las proteínas impurificantes de peso molecular infe-
rior, deben aparecer con posterioridad en los eluidos.

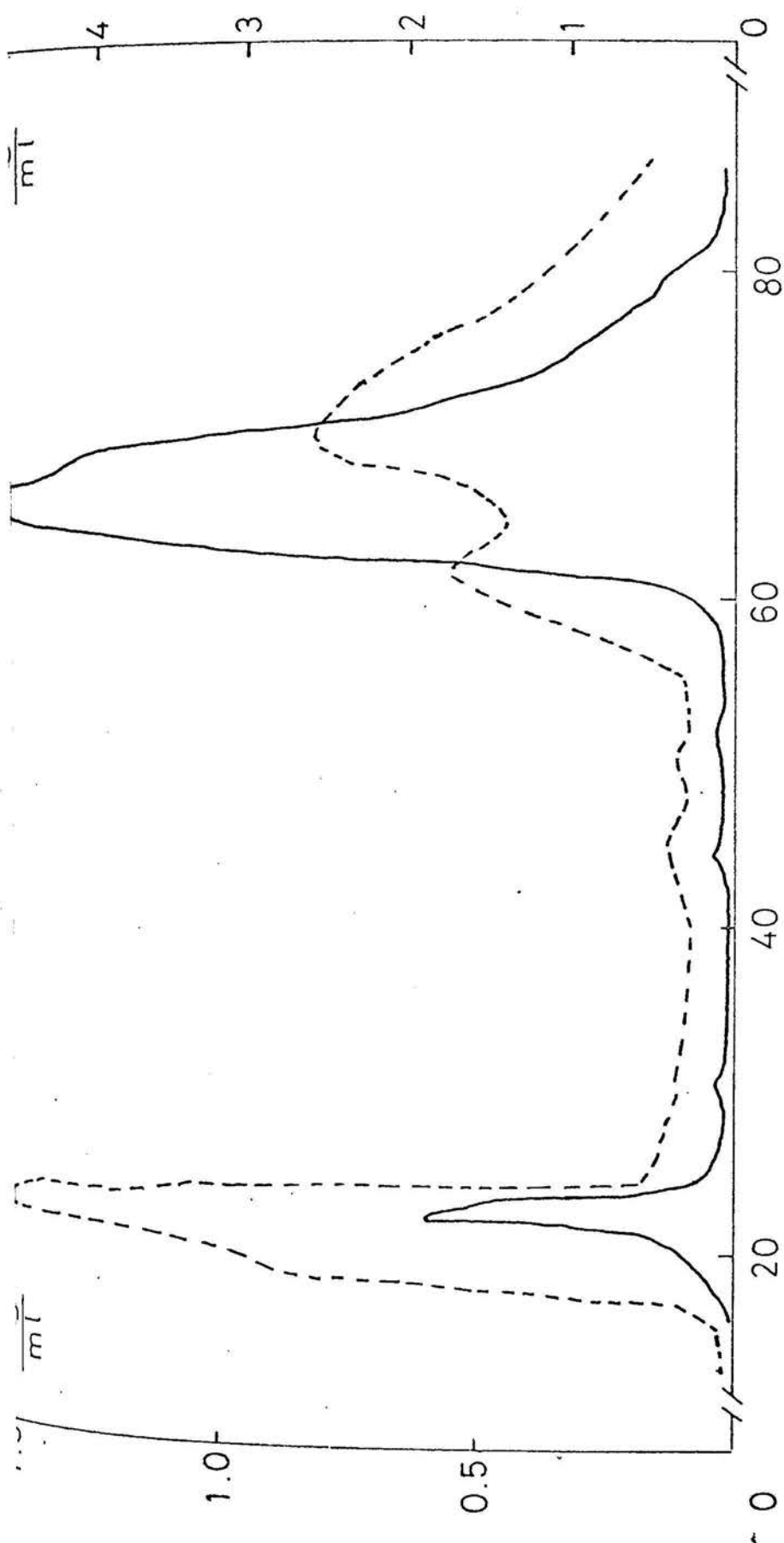


Fig 3 Cromatografía en DEAE - celulosa de purificados parciales de X0.

Eluyente tampón de fosfato sódico pH 7,4 1.0 mM 2.0 gradiente 400 ml 1 mM + 200 ml 0,1 M

(—) mg proteína/ml ; (---) Unidades/ml

Para proceder a la separación cromatográfica se disolvieron 1,3 g del precipitado obtenido en la etapa anterior, en la menor cantidad posible de tampón de fosfato sódico 0,05 M de pH 7,4, que se vertieron cuidadosamente sobre la resina ; la elución se verificó con el mismo tampón utilizado en la dilución.

Se recogen fracciones de 5 ml en el mismo colector utilizando en la separación, cromatográfica anterior y con la misma velocidad de elución. Los resultados obtenidos en la cromatografía son los que se muestran en la fig. 4.

Una vez reunidas las fracciones activas se llevan al 65% de saturación en sulfato amónico y el precipitado se recoge por centrifugación, según la técnica habitual.

El aumento en la actividad específica que se consigue en esta etapa es de aproximadamente 1,5 veces, por lo que es conveniente su introducción como una de las etapas de purificación.

Los resultados que se obtienen en las últimas fases del presente proceso de purificación aparecen en la tabla X.

T A B L A X

ACTIVIDAD XO DE LOS PURIFICADOS CROMATOGRÁFICOS

Muestra	Volumen (peso) (ml) (g)	U/ml(g)	U _t	mgP/ml (g)	A.E.	G.P.
R ₅	7,4	290,47	2.149	87,16	3,33	40,15
E1.DEAE	155,33	3,71	576,2	0,317	13,79	141,0
R DEAE	2,05	237,0	485,9	18,42	12,87	155,0
E1.G-200	95,25	3,41	324,8	0,168	20,27	244,0
R G-200	1,75	178,21	296,3	8,37	21,28	256,0

Como puede observarse en la tabla anterior, se ha obtenido un purificado 256 veces más activo que el tejido hepático de partida.

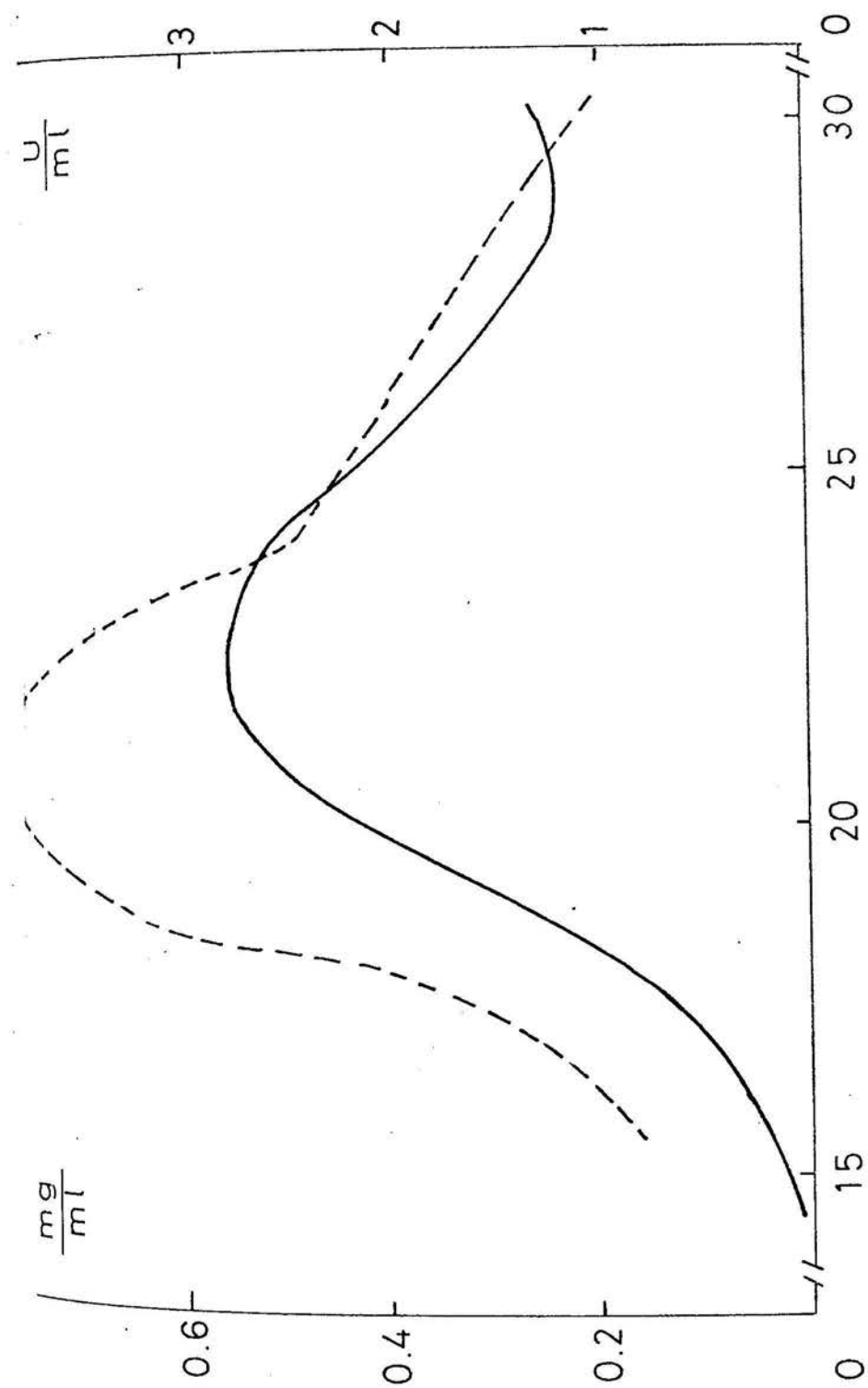


Fig. 4 Cromatografía en gel de Sephadex G-200 de purificados parciales de X0
 Eluyente tampón de fosfato sódico pH 7,4 50 mM
 (—) mg proteína/ml ; (---) Unidades/ml

4.1.6 PROCESO DE PURIFICACION

Las experiencias descritas en los apartados anteriores, constituyen el soporte experimental que nos ha permitido adoptar el proceso de purificación de la XO, cuyas etapas sucesivas se detallan a continuación:

1º El material de partida es hígado de buey, obtenido en el matadero local de animales recién sacrificados. Se eliminan las adherencias grasas y el tejido conjuntivo del hígado y se tritura el material en un triturador de cuchillas, con el fin de facilitar su homogeneización posterior. El tejido triturado se homogeneiza a 42C mediante un Potter-Elvehjem, en presencia de 7 ml de sacarosa 0,25 M por cada gramo de tejido hepático. La preparación se inicia con 168 g de hígado de buey.

Del homogeneizado así obtenido, se separan 20 ml que se suspenden en 480 ml de tampón de fosfato sódico 0,1 M de pH 7,4 y se mantienen en agitación durante 3 h, al final de cuyo intervalo se eliminan los restos sólidos por centrifugación a 1.500 xg, 15 min. y 42C ; en el sobrenadante se determina el contenido en proteína.

2º El homogeneizado obtenido se centrifuga a 15.000xg, durante 1 h a 42C, con el fin de eliminar las mitocondrias pesadas y ligeras, así como las partículas acompañantes de análoga velocidad de sedimentación. Se obtiene un sobrenadante (S₁) exento de actividad uricásica.

3º Al sobrenadante (S₁), se le adiciona 1 ml de tampón de fosfato sódico 0,5 M de pH 7,4 por cada 9 ml (S_{1t}). Se introduce el conjunto en un matraz de fondo redondo, el cual se sumerge en baño de agua a temperatura de ebullición y se mantiene con agitación constante, hasta alcanzar la temperatura de 562C (basta unos 10 min.). Alcanzada dicha temperatura, se lleva a un termostato, que se halla a dicha temperatura, en el que se mantiene durante 30 min. más con agitación constante. Al final de intervalo, se enfría la suspensión a 42C lo más rápidamente posi-

ble, por inmersión en un baño de hielo y sal. La suspensión fría se centrifuga durante 15 min. a 3.000xg a la misma temperatura.

42 El sobrenadante procedente de la centrifugación (S_2), se lleva al 65% de saturación en sulfato amónico, por adición lenta de la sal, en estado sólido, a 42C y mediante agitación constante, que se prolonga durante 1 h a la misma temperatura, después de ajustar el pH a 7,4. Transcurrido este tiempo se deja en reposo durante 8 h, centrifugándose a continuación durante 30 min. a 5.000xg de la forma habitual.

El residuo obtenido (R_3), se disuelve en tampón de fosfato sódico 0,05 M de pH 7,4 en la proporción de 1g de precipitado por cada 5 ml.

52 Se adicionan a la disolución 14 g de sulfato amónico por cada 100 ml de disolución, en la forma acostumbrada, y el precipitado se separa por centrifugación, como se describe en el apartado anterior. Se descarta el precipitado y se recoge el sobrenadante (S_4), que contiene toda la actividad.

62 Al sobrenadante obtenido (S_4) se le añaden 35 g de sulfato amónico por cada 100 ml, con lo que se alcanza el 65% de saturación. Una vez efectuada la adición salina y la centrifugación tal como se ha indicado precedentemente, se recoge el precipitado húmedo (R_5).

Se recogieron 7,4 g de éste cuya actividad XO es de 40 veces la del tejido de partida.

72 7,4g del residuo sólido activo (R_5) se disuelven en unos 10 ml de tampón de fosfato sódico 0,001 M de pH 7,4 y la disolución se somete a diálisis a 42C durante 12 h, en presencia de carbón activo en suspensión, frente al mismo tampón hasta eliminación completa de los iones sulfato.

La muestra dializada se centrifuga a 4.000xg, 10 min. a 42C, para separar la proteína amorfa. La disolución se somete a una se

paración cromatográfica en una columna de DEAE-celulosa preparada de acuerdo a 3.1.4.1. Como eluyente se utiliza el tampón de fosfato sódico anteriormente mencionado. La operación se efectúa a 4°C.

Se recogen fracciones de 10 ml, con una velocidad de elución de 0,5 ml por min., en las que se determina el contenido en proteína. Cuando se observa la ausencia de ésta en los eluidos, se establece un gradiente de fuerza iónica, mediante 400 ml de tampón de fosfato sódico 0,001 M y 200 ml de 0,1 M, ambos de pH 7,4. En los eluidos se determina la actividad XO.

Se reúnen las fracciones con actividad XO y se precipita la proteína con sulfato amónico hasta el 65% de saturación. Se obtuvieron 2,05 g de precipitado activo.

80 El precipitado obtenido se somete a una separación cromatográfica mediante el empleo de una columna de resina Sephadex G₂₀₀.

El precipitado se disuelve en 5 ml de tampón de fosfato sódico 0,05 M de pH 7,4, eluyéndose en la columna mediante el mismo tampón a una velocidad de 0,5 ml por min. Se recogieron fracciones de 5 ml. La elución se efectúa igualmente a 4°C.

Se reúnen las fracciones activas y se precipita la proteína con sulfato amónico hasta el 65% de saturación.

El precipitado (1,75g) muestra una actividad 256 veces mayor que la del hígado de partida ; el rendimiento es del 10%.

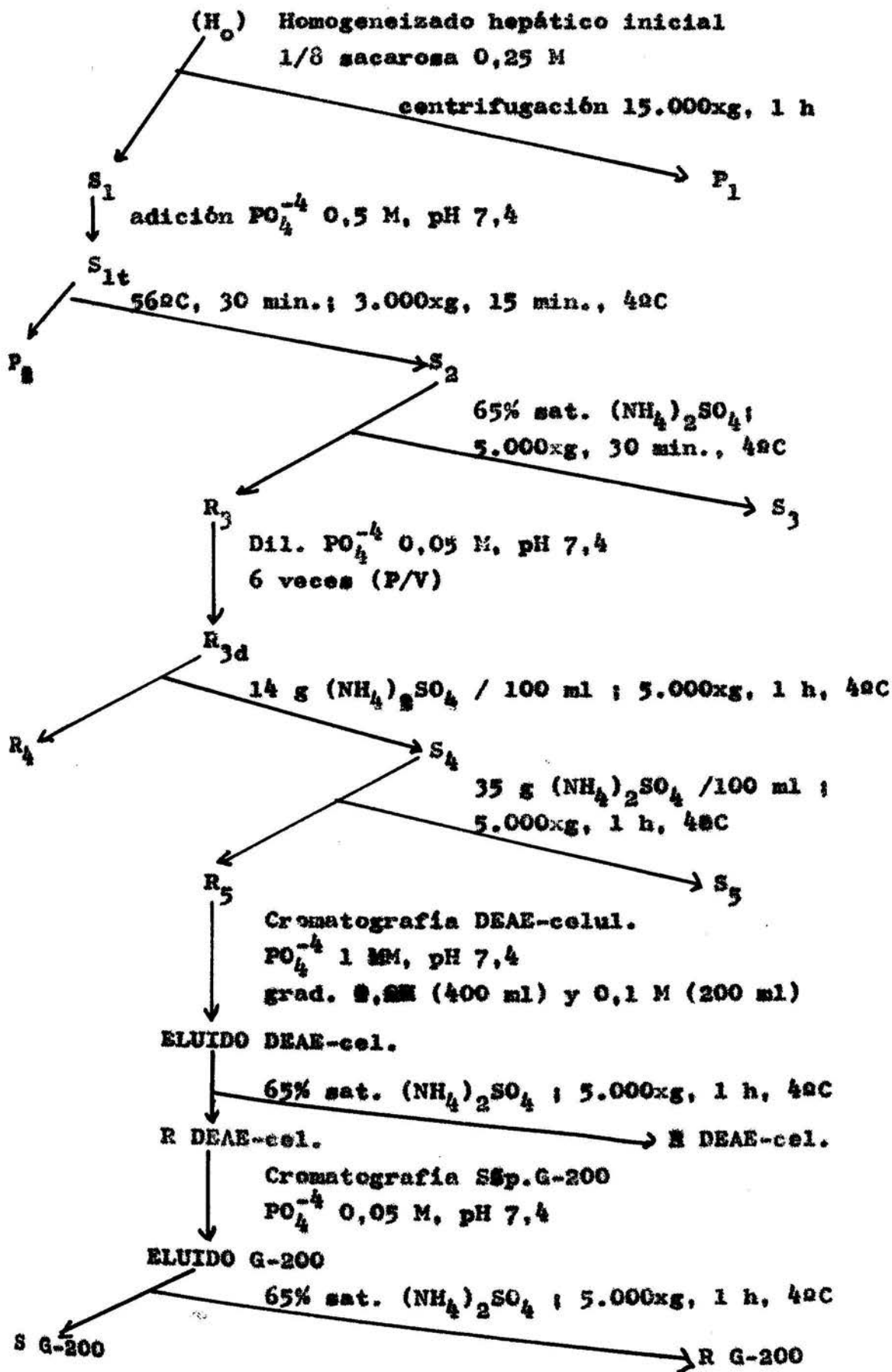
En la tabla XI se recogen los diversos aspectos del proceso de purificación.

T A B L A XI

ETAPAS DE LA PURIFICACION DE LA XO

Muestra	Volumen (Peso) (ml) (g)	U/ml(g)	U _t	mgP/ml(g)	A.E.	G.P.
H ₀	1.300,0	2,4	3.120	28,79	0,083	-
S ₁	1.143,0	2,58	2.950	15,73	0,164	1,98
S _{1t}	1.270,0	2,31	2.933	13,15	0,170	1,99
S ₂	1.120,0	2,4	2.680	4,90	0,579	6,44
R _{3d}	142,0	16,02	2.275	15,96	1,01	12,96
S ₄	142,0	16,02	2.275	7,95	2,27	27,38
R ₅	7,4	290,47	2.162	87,16	3,33	40,15
E1 DEAE	155,3	3,71	576	0,32	11,70	141,0
R DEAE	2,0	237,0	486	18,42	12,87	155,0
E1 G-200	95,25	3,41	325	0,17	20,27	244,0
R G-200	1,75	178,21	296	8,37	21,28	256,0

ESQUEMA DEL METODO DE PURIFICACION DE LA XO



4.2. VARIACION DE K_M Y $V_{m\acute{a}x}$ CON EL pH DE LA XO Y DE LA XDH

Se ha determinado la variaci3n que experimentan los valores de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ con el pH, en los sistemas HIPOXANTINA-XO-XANTINA ; XANTINA-XO-AC. URICO ; XANTINA-XDH-AC.URICO (NAD^+ como aceptor electr3nico) ; NAD^+ -XDH-NADH y XANTINA-XDH-AC.URICO (oxigeno como aceptor electr3nico). Las determinaciones se han efectuado en el intervalo de pH comprendido entre 5,75 y 9,50, en un medio tamponado de tris-fosfato s3dico 0,05 M.

Cuando se utiliza el oxigeno como aceptor electr3nico, se trabaja en contacto con el aire; las disoluciones se hallan saturadas de oxigeno a la temperatura de la reacci3n, $30 \pm 0,12C$; en estas condiciones s3lo se han calculado los valores de K_M aparentes. Cuando el aceptor electr3nico que se utiliza es el NAD^+ , se calculan los valores reales de K_M y $V_{m\acute{a}x}$.

Los reactivos y los preparados enzimáticos, se llevar3n al pH de reacci3n inmediatamente antes de determinar la actividad enzimática, por el m3todo espectrofotom3trico habitual.

4.2.1 VARIACION CON EL pH DE LOS VALORES DE K_M Y $V_{m\acute{a}x}$, DE LOS SISTEMAS CATALIZADOS POR LA XO.

Se ha determinado en primer lugar, la variaci3n de los parámetros cinéticos de las reacciones catalizadas por la XO, que utiliza el oxigeno como aceptor electr3nico, y en su estado nativo es incapaz de utilizar al NAD^+ .

4.2.1.1 Variaci3n con el pH de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ en el sistema hipoxantina-XO-xantina

Los valores que se obtuvieron para K_M y $V_{m\acute{a}x}$ para los distintos pHs utilizados, así como los correspondientes a pK_M y $\log V_{m\acute{a}x}$ aparecen en la tabla XII.

T A B L A XII

VARIACION DE K_M y $V_{m\acute{a}x}$ CON EL pH RESPECTO A LA HIPOXANTINA

pH	$K_M \times 10^6$	p K_M	$V_{m\acute{a}x}$	log $V_{m\acute{a}x}$
5,75	1,23	5,91	4,09	0,61
6,00	3,91	5,41	6,75	0,83
6,50	4,18	5,38	7,35	0,87
7,00	3,99	5,39	7,69	0,89
7,50	3,89	5,41	7,93	0,90
8,00	3,93	5,40	9,43	0,97
8,50	5,54	5,26	9,09	0,96
9,00	10,90	4,96	15,15	1,18
9,50	16,60	4,78	14,28	1,15

La concentración enzimática utilizada fue de 2 U / ml inc.

En todos los casos v = molar transformada/min.

4.2.1.2 Variación con el pH de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ en el sistema xantina-XO-ac.úrico

Los valores que se obtuvieron para K_M y $V_{m\acute{a}x}$ para los distintos valores de pH, así como los correspondientes de p K_M y log $V_{m\acute{a}x}$, aparecen en la tabla XIII.

T A B L A XIII

VARIACION DE K_M y $V_{m\acute{a}x}$ CON EL pH RESPECTO A LA XANTINA

pH	$K_M \times 10^6$	pK_M	$V_{m\acute{a}x}$	$\log V_{m\acute{a}x}$
5,75	3,00	5,52	3,17	0,50
6,00	3,40	5,45	3,20	0,50
6,25	3,70	5,43	3,33	0,52
6,50	3,86	5,41	3,74	0,59
7,00	3,54	5,45	4,29	0,63
7,50	4,53	5,34	5,15	0,71
7,75	6,03	5,22	6,06	0,78
8,00	8,13	5,09	6,17	0,79
8,25	11,70	4,93	7,69	0,89
8,50	33,30	4,48	13,33	1,12
9,00	35,70	4,45	10,52	1,02
9,50	52,60	4,28	10,00	1,00

La concentración enzimática utilizada fue de 2 U / ml inc.

La representación gráfica de los valores de pK_M y de $\log V_{m\acute{a}x}$ frente al pH, según el método de Dixon (101) (102), aparece en la fig. 5, así como los correspondientes a la hipoxantina (véase 4.2.111).

Puede observarse que cuando el sustrato es la hipoxantina, aparece un punto de inflexión, tanto para pK_M , como para $\log V_{m\acute{a}x}$ a aproximadamente pH 6, e igual ocurre alrededor de los valores de pH 8,2 y 9,2. Estos valores de pH corresponderían a los pKs de los grupos ionizables, que participarían en la unión del complejo de la XO-hipoxantina. Cuando el sustrato es la xantina, aparecen puntos de inflexión comunes para valores de pH de aproximadamente 6,2; 7,9; 8,4 y 9,3; pueden atribuirse también a los correspondientes grupos ionizables que forman parte del complejo XO-xantina.

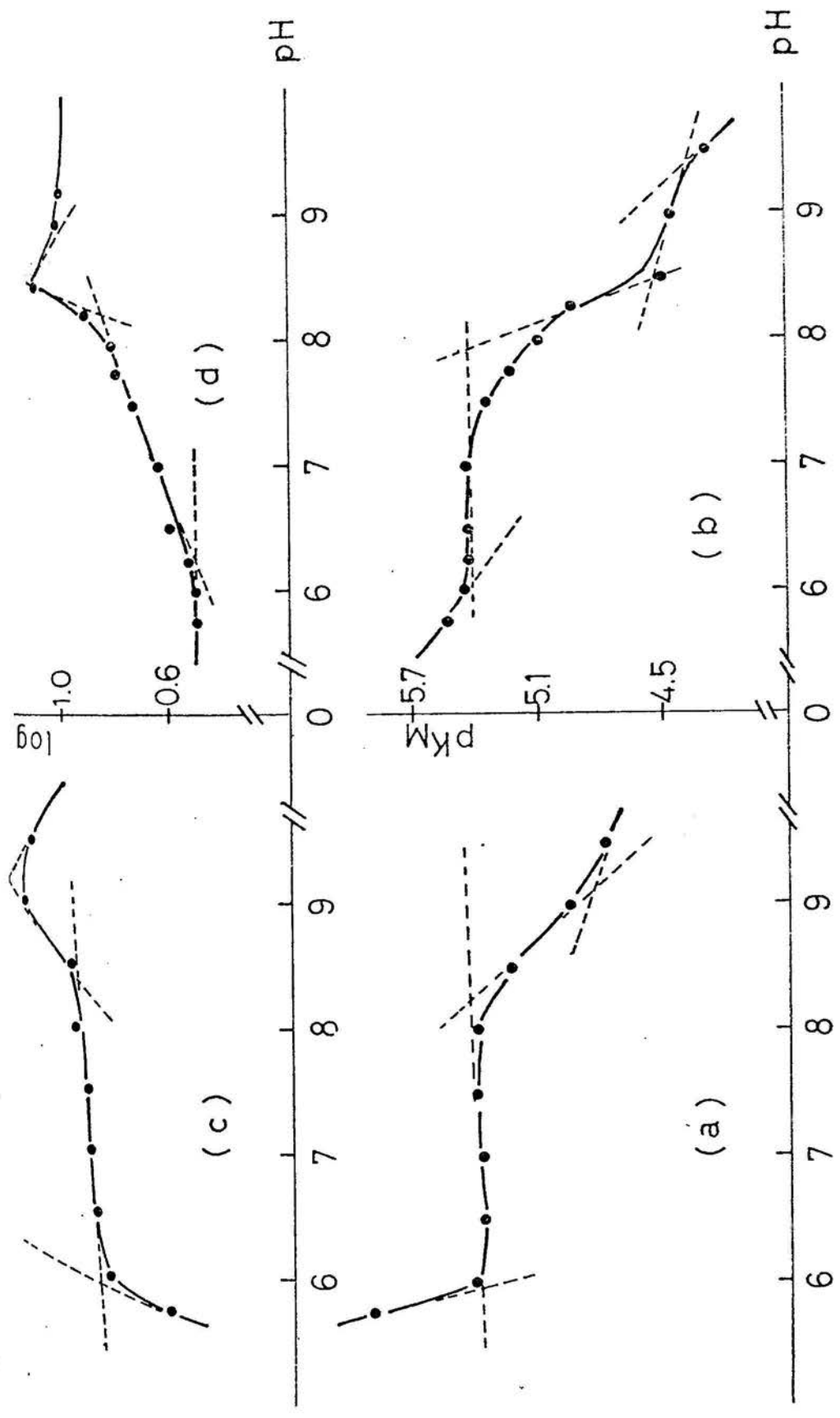


Fig. 5 Variación de pK_M y $\log V_{\max}$ con el pH correspondiente a la NO
 Tampón tris-fosfato sódico 50 mM ; $[XO] = 2$ U/ml
 pK_M respecto a : (a) Xantina ; (b) Hipoxantina ; (c) Xantina ; (d) Hipoxantina
 $\log V_{\max}$ respecto a : (a) Xantina ; (b) Hipoxantina ; (c) Xantina ; (d) Hipoxantina

Con las limitaciones propias del método, cabe sugerir la posibilidad de la intervención de un grupo imidazol de la histidina ($pK= 6,04$), un grupo α -amino de la lisina ($pK= 10,79$) y grupo sulfuro o quizá persulfuro con la significación que se le atribuye en la unión enzima-sustrato (48).

Cuando la xantina es el sustrato aparece en ambas representaciones gráficas un punto de inflexión próximo a $pH 7,9$ y por el hecho de ser el pK del grupo oxo de la xantina $7,44$, se podría identificar con él ; su intervención sería importante en la unión enzima-sustrato.

4.2.2 VARIACION CON EL pH DE LOS VALORES DE K_M Y $V_{m\acute{a}x}$, DE LOS SISTEMAS CATALIZADOS POR LA XDH

Se consideran en este apartado la variación de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ con el pH , en los sistemas en que la transformación de la xantina en ácido úrico, viene catalizada por la XDH, tanto en el caso que utiliza el oxígeno como aceptor electrónico, como cuando es el NAD^+ el transportador.

4.2.2.1 Variación con el pH de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ en el sistema xantina-XDH-ac.úrico y NAD^+ -XDH-NADH

Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_M real, correspondientes a la xantina y al NAD^+ , para los distintos valores de pH , se recogen en la tabla XIV y su representación gráfica, por el método de Dixon (loc.cit.), aparece en la fig. 6.

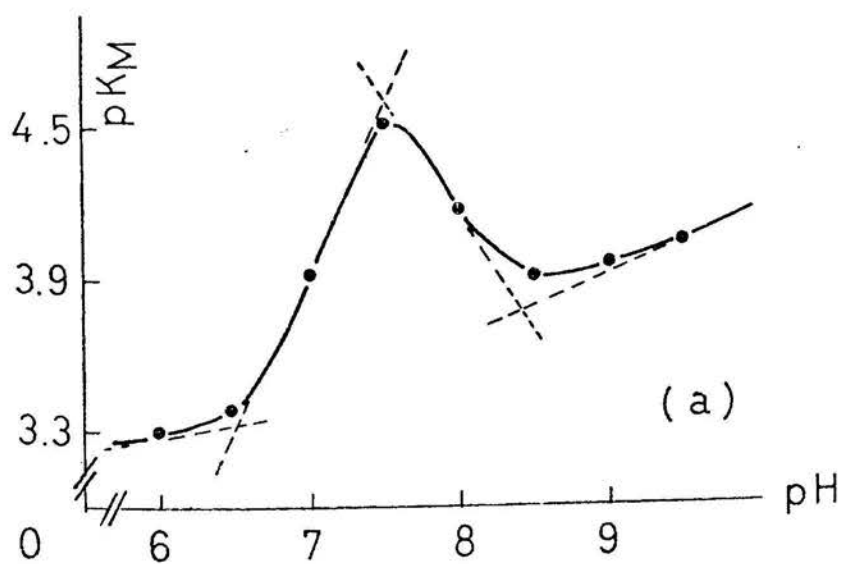
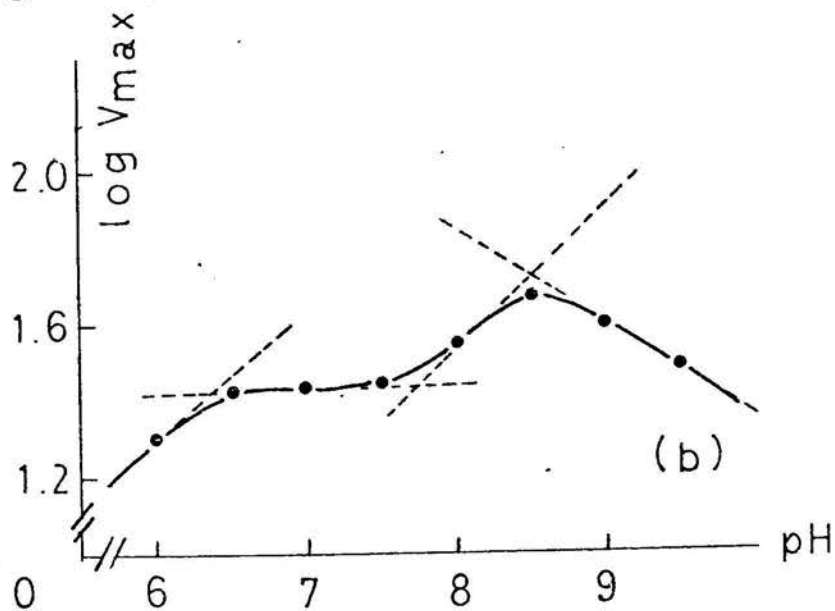
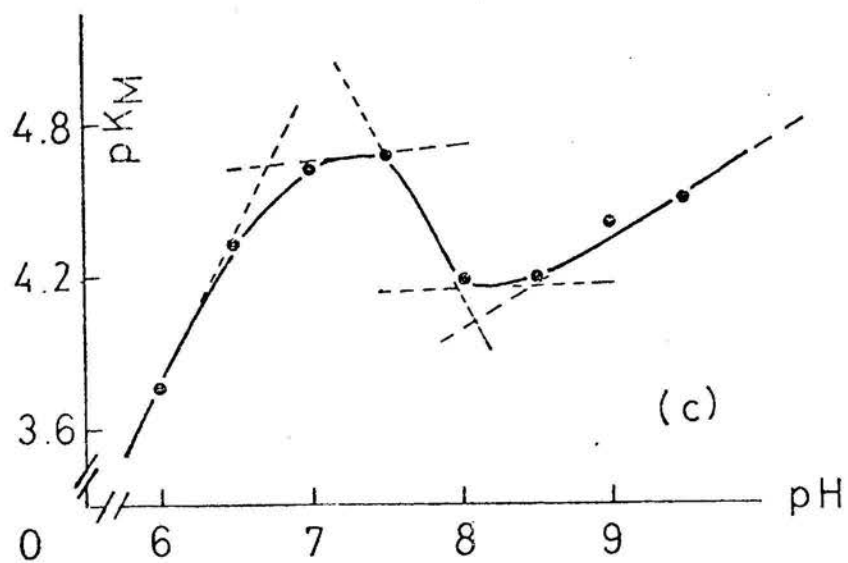


Fig. 6 Variación de pK_M y $\log V_{\max}$ con el pH correspondiente a la XDH en el S_a: XANTINA-NAD⁺-XDH-AC.URICO-NADH
 Tampón tris-fosfato 50 mM; [XDH] = 16 U/ml
 pK_M respecto a : (a) NAD⁺; (c) xantina. (b) $\log V_{\max}$ S_a

T A B L A XIV

VARIACION DE K_M y $V_{m\acute{a}x}$ CON EL pH RESPECTO A LA XANTINA
y AL NAD^+

pH	$K_M \times 10^5$ xantina	pK_M xantina	$K_M \times 10^4$ NAD^+	pK_M NAD^+	$V_{m\acute{a}x}$	$\log V_{m\acute{a}x}$
6,00	18,00	3,75	5,10	3,30	20,00	1,30
6,50	4,90	4,31	4,20	3,37	26,30	1,42
7,00	2,40	4,62	1,00	4,00	27,00	1,43
7,50	2,20	4,66	0,30	4,52	27,70	1,44
8,00	2,70	4,17	0,69	4,16	34,50	1,54
8,50	6,60	4,18	3,20	3,90	47,60	1,67
9,00	4,00	4,40	1,30	3,95	39,90	1,60
9,50	3,20	4,50	1,00	4,00	30,90	1,49

La concentración enzimática utilizada fue 16 U/ml inc.

Se puede observar la existencia de puntos de inflexión aproximadamente a pH 6,5 , 7,7 y 8,5, que aparecen tanto al representar los valores pK_M de la xantina y del NAD^+ y los de $\log V_{m\acute{a}x}$. El hecho sugiere que se trata de los pKs que corresponden a grupos ionizables del complejo enzima-sustrato, que son imprescindibles para que tenga lugar la reacción. Podría tratarse de un grupo persulfuro y del grupo imidazol de la histidina en correlación con lo descrito anteriormente para la hipoxantina, sin embargo, es difícil adscribir el pK de 7,7 , aunque pudiera corresponder a un grupo α -amino.

En la representación correspondiente a pK_M de la xantina aparece una inflexión que no muestran las otras gráficas y está situado alrededor de pH 8 y que podría muy bien ser debido al grupo oxo de la xantina.

4.2.2.2 Variación con el pH de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ en el sistema xantina-XDH-ác.úrico con el oxígeno como aceptor electrónico

La XDH, en ausencia de NAD^+ , y en medio aerobio es capaz de utilizar el oxígeno como aceptor electrónico. La reacción está poco favorecida y puede observarse que se precisa que la concentración de XDH en el incubado sea el doble que la que se emplea en las experiencias descritas en el apartado anterior. En la tabla XV aparecen los correspondientes valores y su representación gráfica en la fig. 7.

T A B L A XV

VARIACION DE K_M y $V_{m\acute{a}x}$ CON EL PH RESPECTO A LA XANTINA

pH	$K_M \times 10^6$	pK_M	$V_{m\acute{a}x}$	$\log V_{m\acute{a}x}$
6,00	1,80	5,75	2,10	0,30
6,50	3,50	5,40	2,60	0,42
7,00	3,90	5,30	2,70	0,43
7,50	6,00	5,20	2,75	0,43
8,00	6,00	5,20	3,50	0,55
8,50	8,10	5,10	4,70	0,65
9,00	11,00	4,90	3,90	0,59
9,50	33,00	4,50	3,10	0,50

La concentración enzimática utilizada fue de 32 U/ml inc.

Puede observarse en la correspondiente representación la existencia de puntos de inflexión comunes a pH 6,5 , 7,5 y 8,75, que correspondían al grupo imidazol de la histidina, a un grupo persulfuro característico de la xantinoxidasa y al grupo oxo de la xantina, todos los cuales intervienen en la unión enzima-sustrato.

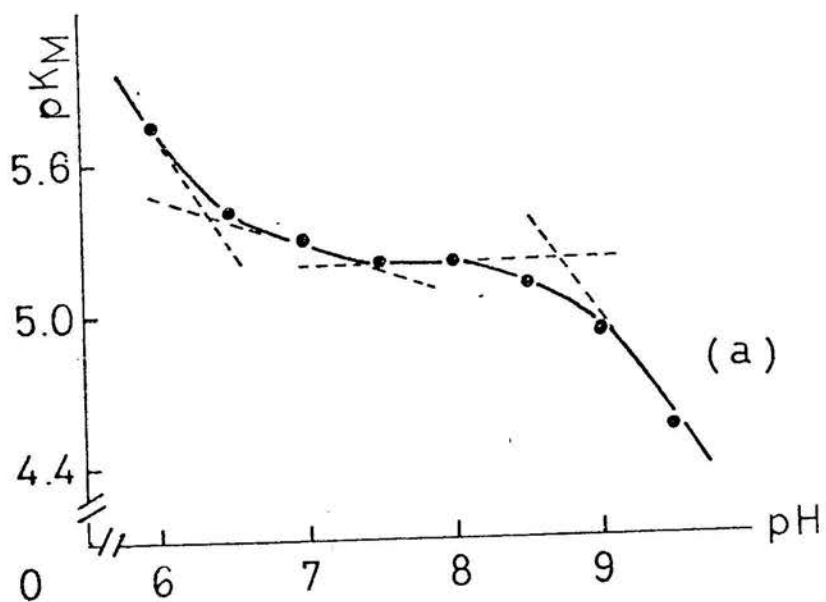
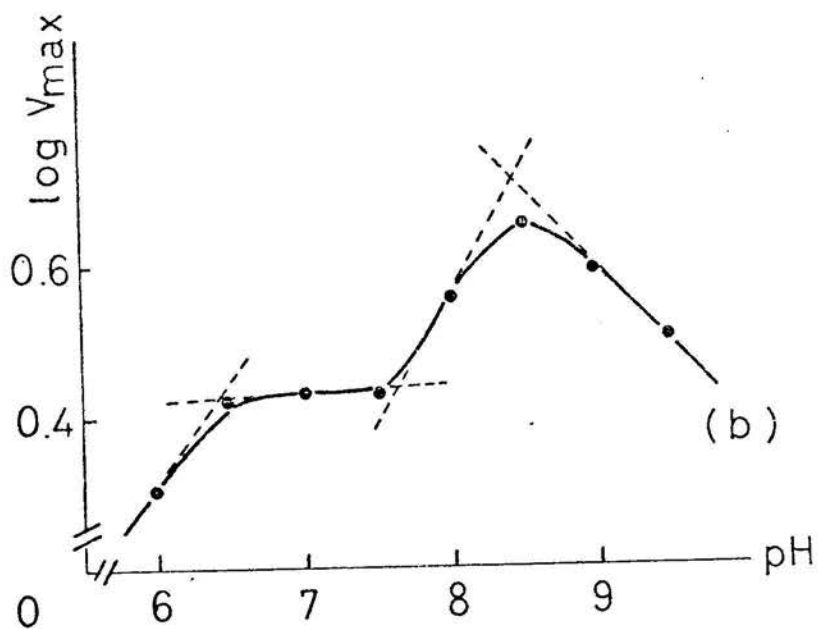


Fig. 7 Variación de pK_M y $\log V_{\text{máx}}$ con el pH correspondiente a la XDH en el Sa: XANTINA- O_2 -XDH-AC.URICO- H_2O_2
 Tampón tris-fosfato 50 mM $[XDH] = 32$ U/ml
 (a) pK_M xantina. (b) $\log V_{\text{máx}}$ xantina

En la tabla XVI se han reunido los valores de los puntos de inflexión correspondientes a las representaciones de Dixon de los sistemas en estudio.

Puede observarse, que aparecen dos grupos que se repiten en todas las representaciones, y que podrían corresponder al grupo imidazol de la histidina, cuyo nitrógeno sería el que, según sugiere OLSON (48), se encuentra próximo al molibdeno y cuyo papel es fundamental en la catálisis ; el otro grupo sería persulfuro, que se postula que es fundamental en la unión entre el enzima y el sustrato, para que tenga lugar ~~la~~ catálisis enzimática.

VALORES DE pK_M Y $\log V_{máx}$ EN LOS SISTEMAS CATALIZADOS POR LA XO Y LA XDH

HIPOXANTINA-O ₂ -XO	XANTINA-O ₂ -XO	XANTINA-NAD ⁺ -XDH	XANTINA-O ₂ -XDH	GRUPO IONIZABLE		
$\log V_m$	pK_M	$\log V_m$	pK_M			
		$\log V_m$	pK_M			
		$\log V_m$	pK_M			
5,95	6,15	6,20	6,75	6,30	6,40	IMIDAZOL (HISTIDINA)
			7,50	7,75	7,50	α -AMONIO
	7,90	8,25	8,00	7,60	7,40	OXO (XANTINA)
8,25	8,40	8,50	8,50	8,45	8,40	PERSULFURO (C.ACTIVO)
9,15	9,30	9,15				Σ -AMONIO (LISINA)

4.3

GRUPOS SULFHIDRILLO Y ACTIVIDAD XO Y XDH

La posible intervención de los grupos sulfhidrilo en el ciclo catalítico de la XO y de la XDH, ha sido sugerida al observar la variación de los valores de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ con el pH en todos los sistemas estudiados.

Por otra parte, se postula que la intervención de los grupos persulfuro en la unión enzima-sustrato es esencial para la actividad catalítica de la xantinoxidasa de distintas procedencias (48).

Se ha procedido a la investigación de la existencia de tales grupos en la molécula de ambas enzimas y la posible aparición de grupos sulfhidrilo. Por tanto se ha intentado determinar el efecto que producen sobre la actividad catalítica de la XO y de la XDH determinados reactivos característicos de los grupos SH .

4.3.1

INHIBICION DE LA XO POR PCMB

El efecto inducido por el PCMB sobre la actividad catalítica de la XO, se ha determinado frente a diversas concentraciones del reactivo, manteniendo constantes la del enzima y la de la xantina.

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla XVII.

T A B L A X V I I
I N H I B I C I O N D E L A X O P O R E L P C M B

PCMB $M \times 10^6$	% INHIBICION		
	sin preincubación previa	preincubación	
		60 min	120 min
0,01	2,5	2,4	2,4
0,1	5,0	5,0	4,9
1	16	15	14
10	88	85	87
100	100	100	98

XO = 2 U/ml inc. ; xantina = 0,1 mM ; t.fosf.sódico 50 mM, pH 8

La inhibición inducida por el PCMB sobre la actividad de la XO, puede llegar a ser completa aún en presencia de concentraciones relativamente bajas de reactivo (0,1 mM).

La inhibición no crece al preincubarse la XO y el agente inhibidor, aún en periodos más prolongados. En efecto, al preincubar durante 220 min., la muestra de composición habitual, en la que la concentración de PCMB fue de 1×10^{-6} , se modifica el porcentaje de inhibición obtenido (14%).

4.3.1.1 Carácter de la inhibición ejercida por el PCMB sobre la XO

El carácter reversible ó irreversible de la inhibición ejercida sobre la XO, por el PCMB, se ha establecido por determinación de las velocidades iniciales de reacción en muestras que contenían concentraciones crecientes de XO en ausencia de inhibidor y de otras que contenían, además concentraciones crecientes

tes de PCMB, sin establecer contacto previo entre ambos.

Los resultados que se obtienen con concentraciones de PCMB 3×10^{-6} M, 5×10^{-6} M y en ausencia del inhibidor, son los que aparecen en la fig. 8. Se observa en ella, que las rectas obtenidas con las dos concentraciones de PCMB y la recta control, no se cortan en el origen lo que indica que la inhibición por PCMB es irreversible ó pseudoirreversible.

4.3.1.2 Reversibilidad de la inhibición inducida por el PCMB sobre la XO

Con objeto de comprobar el carácter irreversible o pseudoirreversible de la inhibición por PCMB, se han efectuado experiencias en las que se mantienen en contacto, XO (3 U/ml) con concentraciones variables de PCMB a $30 \pm 0,12^\circ\text{C}$ durante 30 min.; transcurrido el intervalo de contacto se dializan las muestras durante 20 h a 42°C , frente a tampón de fosfato sódico 0,05 M de pH 8.

Finalizada la diálisis, se determinó la actividad de las muestras frente a las concentraciones de sustrato acostumbradas. Las velocidades halladas resultaron idénticas, tanto en los casos en que se habían utilizado distintas concentraciones de PCMB, como cuando las muestras no lo contenían.

Los resultados indican, que la inhibición ejercida por el PCMB es reversible por diálisis.

4.3.1.3 Efecto del 2-Mercaptoetanol (2-ME) sobre la inhibición inducida por el PCMB sobre la XO

El 2-ME no ejerce efecto alguno sobre la actividad XO aún a concentración tan elevada como 10 mM.

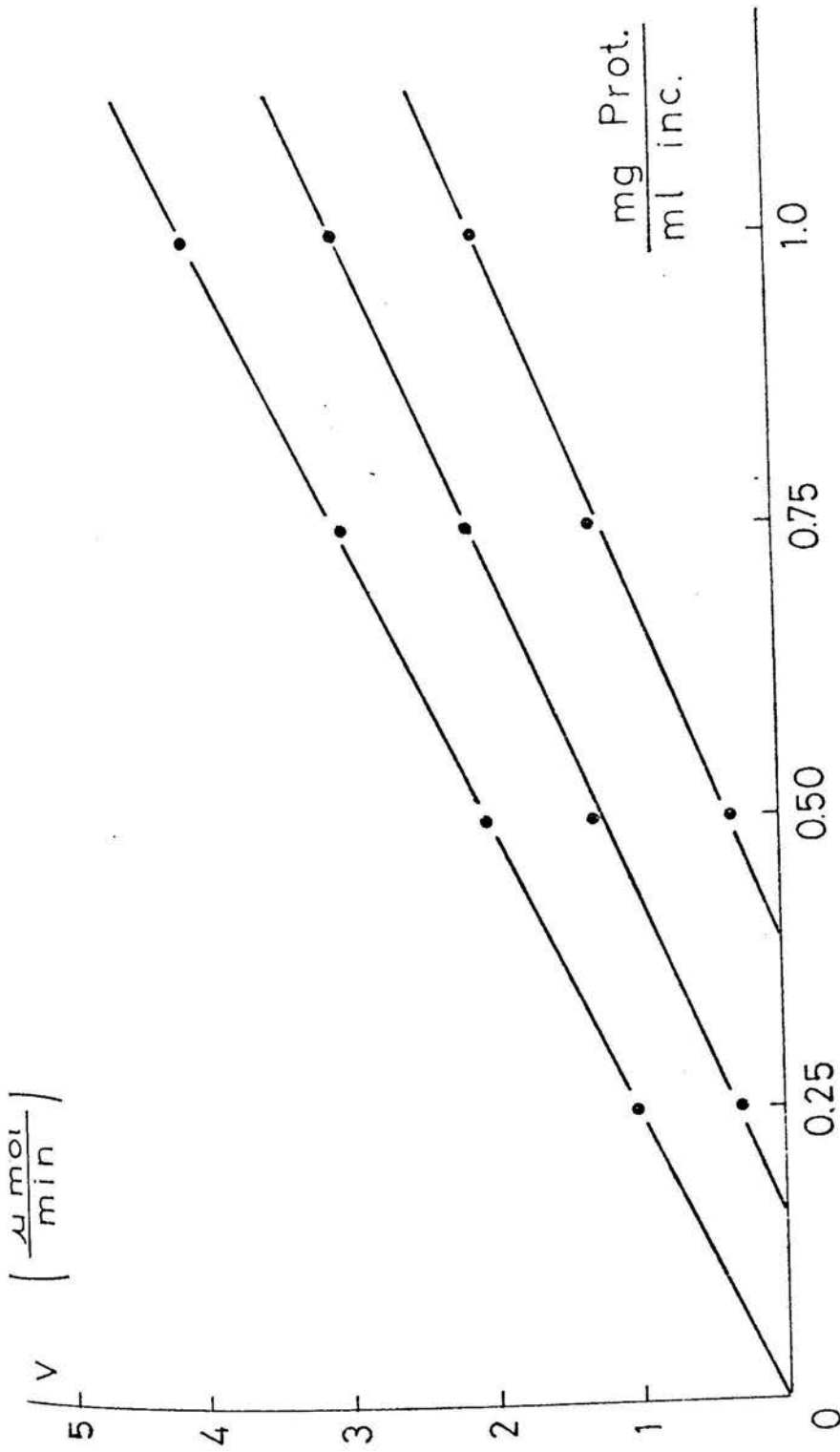


Fig. 8 Inhibición reversible de la XO por el PCMB; Se XANTINA-O₂-XO-AC. URICO-H₂O₂
 Tampón fosfato sódico 50 mM; pH 8 ; [xantina] = 1 x 10⁻⁴ M
 [PCMB] x 10⁶ M⁻¹ de abajo a arriba 5 ; 3 ; 0

Se mantuvo la XO en contacto con PCMB, cuya concentración provoca inhibición. En muestras paralelas, se añadió 2-ME 1 mM. Al determinar la actividad se observa, que la adición de 2-ME anula la inhibición inducida por el PCMB, de modo instantáneo,

La recuperación de la actividad es independiente del tiempo que hayan permanecido en contacto el enzima y el PCMB. Este hecho concuerda con la observación previa de que, el grado de inhibición, que provoca el PCMB, es independiente del tiempo de contacto previo.

4.3.1.4 Cinética de la inhibición inducida por el PCMB sobre la XO

Se ha demostrado (véase 4.3.1.1), que el PCMB es inhibidor pseudorreversible de la XO, y que la actividad se recupera por diálisis. El hecho sugiere, que la unión entre el enzima y el inhibidor es muy débil en ausencia del sustrato xantina.

Por otra parte, la inhibición que ejerce el PCMB en presencia de xantina y sin contacto previo es de naturaleza irreversible (véase fig. 8).

Los hechos comentados, sugieren que cualquiera que sea la naturaleza de la inhibición provocada por el PCMB, será de tipo no competitivo puro.

Se ha podido confirmar la hipótesis, ya que la inhibición es de tipo no competitivo puro, de carácter lineal (fig. 9).

4.3.1.5 Valoración de grupos -SH de la XO con PCMB

La valoración de grupos sulfhidrilo o persulfhidrilo libres en la XO se ha efectuado por el método de Boyer (véase 3.2.6).

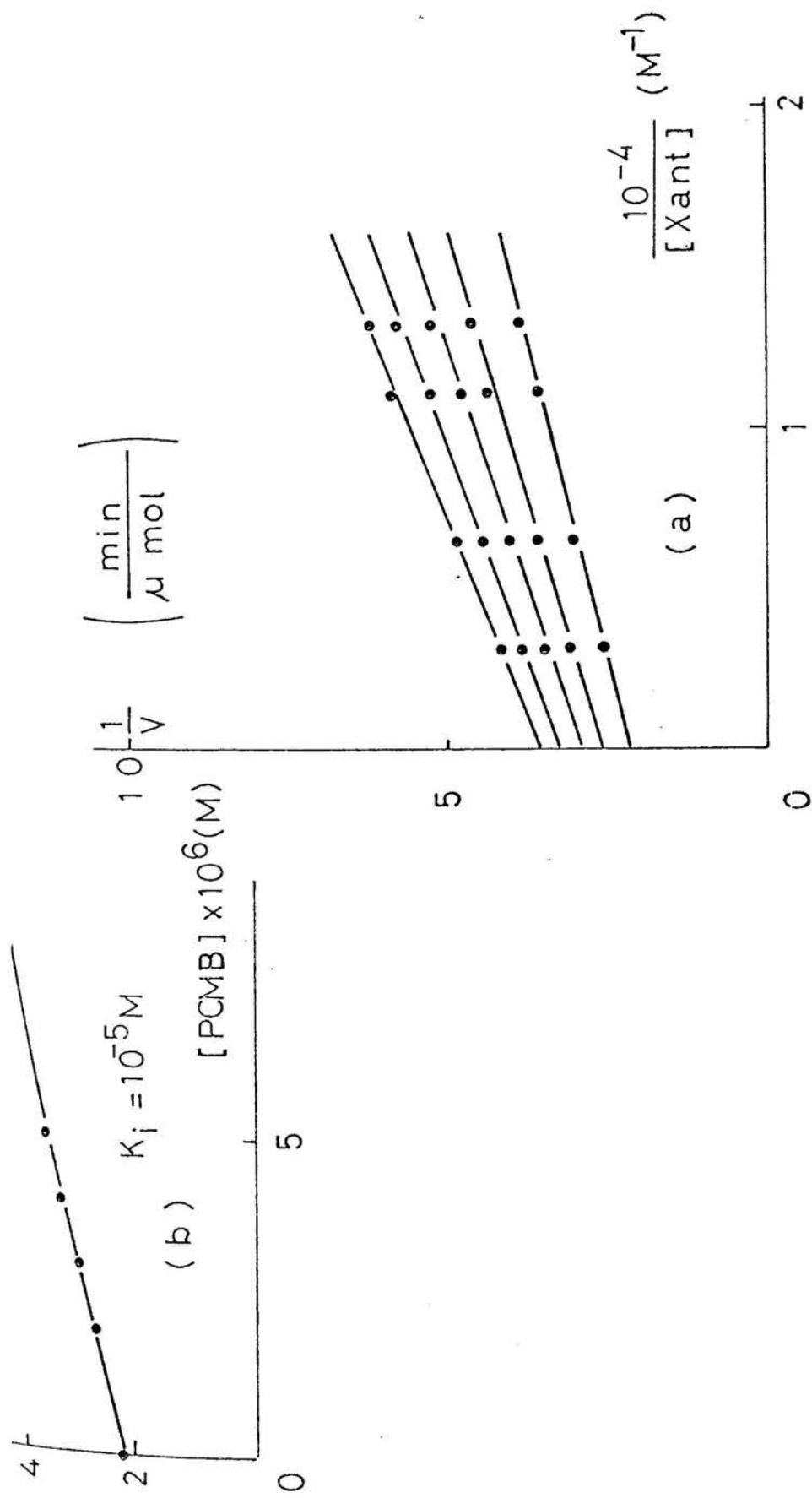


Fig. 9 Inhibición por PCMB de la XO (Se XANTINA- O_2 -XO-AC.URICO- H_2O_2)
 Tampón fosfato sódico 5 mM pH 8 ; $[XO] = 0,4$ U/ml
 (a) Carácter de la inhibición ; $[PCMB] \times 10^6 M^{-1}$ de abajo a arriba: 0;2;3;4;5
 (b) Representación secundaria de intersecciones de la Fig. 9 a

Las muestras contenían cantidades crecientes de XO (1×10^{-6} a 1×10^{-5} M). La concentración de PCMB en el incubado se mantuvo constante (1×10^{-5} M). Se midieron las densidades ópticas a diferentes intervalos de tiempo, en las distintas muestras, hasta 3 h como máximo, sin que se observase ninguna variación, lo cual constituye indicio de que no existen grupos sulfhidrilo o persulfhidrilo libres en la molécula de la XO.

Puesto que se ha postulado la existencia de grupos persulfuro en la molécula de la Xantinoxidasa (32) (33) (48) (49), cabe suponer, que se hallan situados de modo que se establezca unión con el átomo de molibdeno, con lo cual quedarían protegidos de la acción del PCMB.

4.3.2 ACCION NULA DEL DTNB SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA XO

Se estudia, a continuación, la acción del DTNB, reactivo característico de los grupos sulfhidrilo.

Las experiencias se han efectuado con las concentraciones enzimáticas habituales y en condiciones experimentales análogas a las de las utilizadas con el PCMB ; las concentraciones de DTNB estuvieron comprendidas entre 1×10^{-6} y 3×10^{-4} M. Tanto en las experiencias sin contacto previo, como cuando éste se prolongó durante 1 h, el DTNB no produce variaciones significativas de la actividad enzimática.

4.3.3 INHIBICION DE LA XO CON EA NEM

La acción que induce la NEM sobre la actividad XO, se ha determinado en las condiciones experimentales y con las concentraciones de enzima y de sustrato idénticas a las utilizadas en las experiencias con el PCMB.

El reactivo inhibe la actividad de la XO, aunque en menor grado que el PCMB.

La NEM, 1×10^{-3} M, provoca una inhibición del 100% y sólo es del 5% cuando su concentración es 1×10^{-6} M.

La inhibición no es progresiva, ya que al mantener en contacto la XO con el reactivo durante tiempos de hasta 3 h, a $30 \pm 0,10$ C, con distintas concentraciones de éste (hasta 3×10^{-5} M), que provocan inhibición del 75%, no se incrementa el grado de la inhibición.

4.3.3.1 Carácter de la inhibición ejercida por la NEM sobre la XO

El carácter reversible o irreversible de la inhibición ejercida por la NEM sobre la XO, se ha establecido por medida de las velocidades iniciales de reacción en muestras que contenían concentraciones crecientes del enzima en ausencia de inhibidor, y de otras que contenían, además, distintas concentraciones de NEM, sin establecer contacto previo entre el inhibidor y el enzima.

Los resultados obtenidos aparecen en la fig. 10. Puede observarse, que las distintas rectas pasan por el origen, lo que indica que la inhibición ejercida por la NEM es de carácter reversible.

4.3.3.2 Cinética de la inhibición inducida por la NEM sobre la XO

La inhibición reversible que provoca la NEM, sobre la XO permite su caracterización cinética, e indica el centro de la molécula del enzima sobre el que actúa el agente inhibidor.

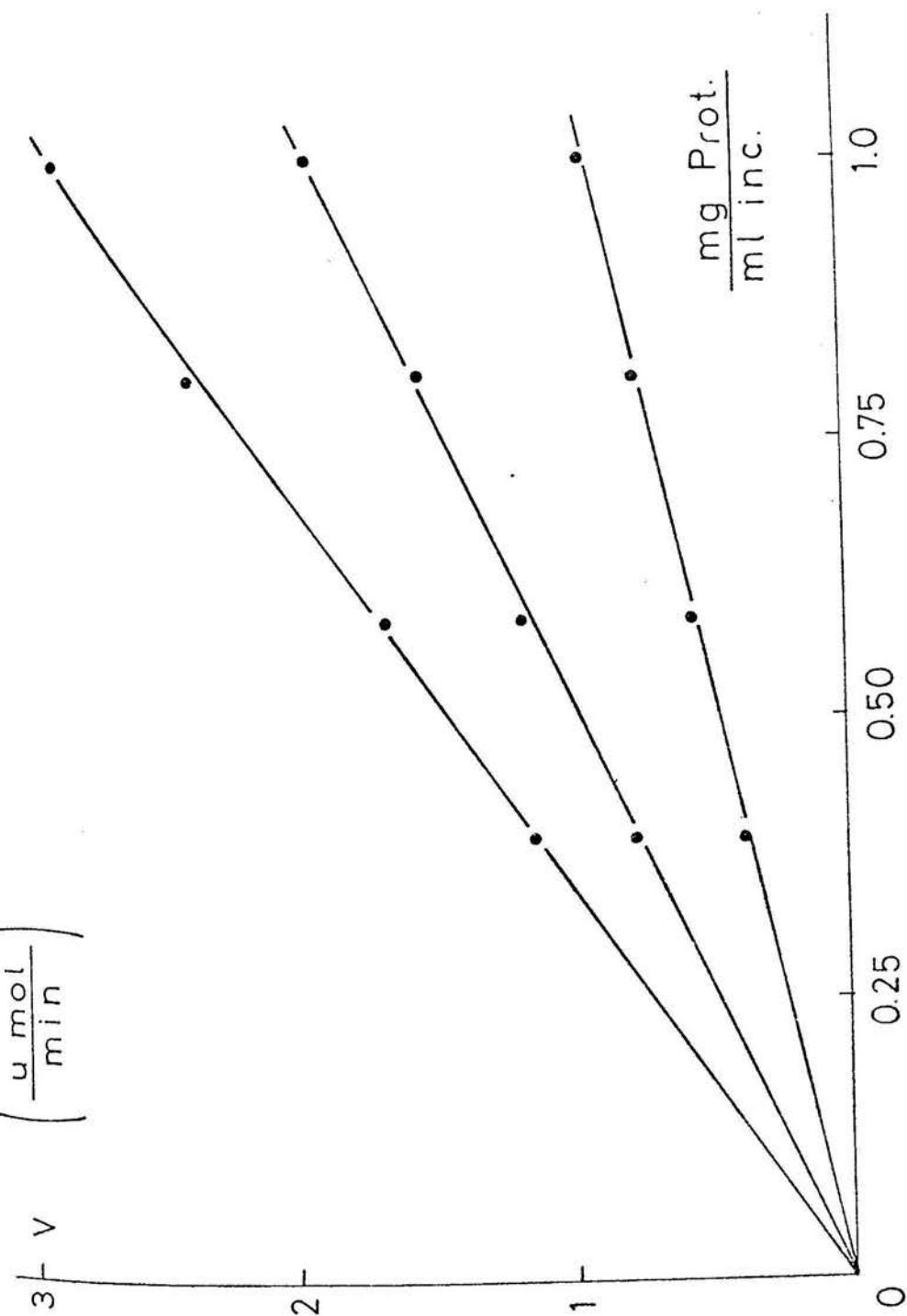


Fig. 10 Inhibición por NEM de la XO (Sa XANTINA-O₂-XO-AC.URICO-F₂O₂)
 Tampón fosfato sódico 5 mM pH 8 ; [xantina] = 1x10⁻⁴ M
 De abajo a arriba [NEM] x 10⁵ M⁻¹ = 2; 1; 0

Los resultados obtenidos aparecen en la fig. 11 ; se puede observar que la inhibición es de tipo competitivo de carácter no lineal. La representación secundaria de las pendientes es de tipo hiperbólico (fig. 11), lo que sugiere que la acción del inhibidor, se realiza al azar, o bien, que los complejos que pudieran originarse en la adición del inhibidor se transformen e con una cierta velocidad.

4.3.4 INHIBICION DE LA XO CON IAM

En el estudio de las acciones que inducen los reactivos de grupos sulfhidrilo sobre la actividad catalítica de la XO, se ha determinado la influencia de la IAM.

Las condiciones de experimentación fueran las indicadas en los apartados anteriores.

La inhibición que provoca la IAM no es muy destacada, ya que cuando la concentración es 1×10^{-5} M, la inhibición es del 7,5% y solamente llega a ser del 38% cuando es de 1×10^{-3} M.

El efecto inhibidor de la IAM no es progresivo a lo largo del tiempo, ya que manteniendo en contacto el enzima y el reactivo 180 min. no se observa incremento en el grado de inhibición.

4.3.4.1 Carácter de la inhibición ejercida por la IAM sobre la XO

En la determinación del carácter reversible o irreversible de la inhibición ejercida por la IAM, se procedió a medir las velocidades iniciales de reacción de muestras que contenían concentraciones crecientes de la XO en ausencia del inhibidor y de otras que contenían, además, concentraciones de IAM sin contacto previo entre el inhibidor y el enzima.

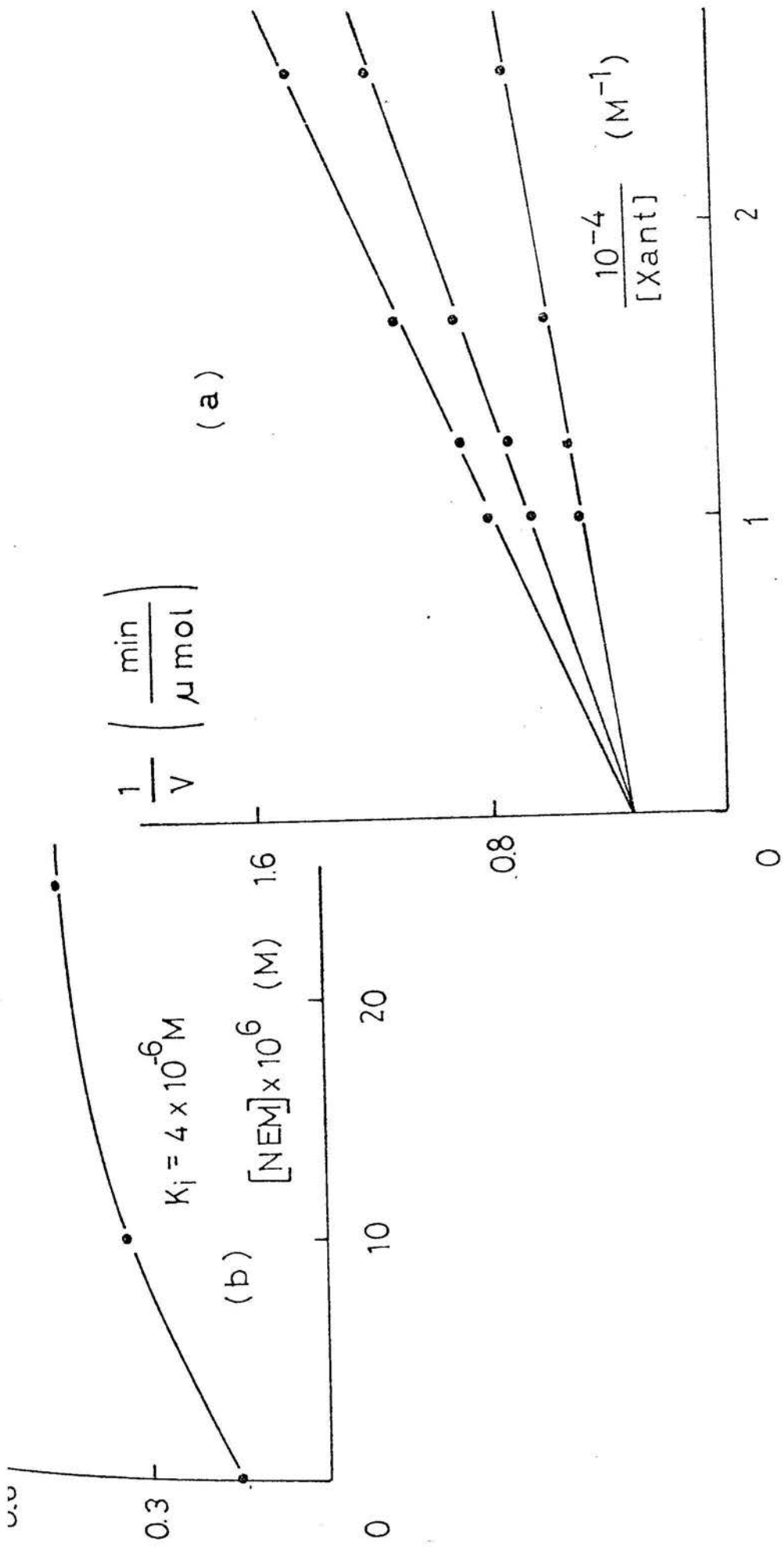


Fig. 11 Inhibición por NEM de la XO (SALSALINA-O₂-XO-AC. URICO-H₂O₂)

Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6 ; $[XO] = 0,4 \text{ U/ml}$

(a) Representación de Lineweaver-Burck ; de abajo a arriba: $[\text{NEM}] \times 10^5 \text{ M}^{-1} = 0 ; 1 ; 2,5$
 (b) Representación secundaria de pendientes correspondiente a la fig. 11 a

En la fig. 12 puede observarse, que las tres rectas obtenidas, se cortan en el origen lo que demuestra que la inhibición es reversible en estas condiciones.

4.3.4.2 Cinética de la inhibición inducida por la IAM sobre la XO

Se ha procedido a determinar la caracterización cinética de la inhibición reversible que induce la IAM sobre la XO.

Los resultados obtenidos aparecen en la fig. 13 ; en ella se puede apreciar que la inhibición ejercida por la IAM es de tipo acompetitivo con respecto al sustrato xantina. La representación secundaria de las pendientes frente a las concentraciones del inhibidor, resulta ser de tipo hiperbólico, lo cual podría indicar, que el inhibidor se adicional al azar, o bien, que el complejo formado por el enzima y el inhibidor tuviese una cierta velocidad de reacción, en analogía a lo que ocurre con la NEM.

Los reactivos de los grupos sulfhidrilo, con los que se ha experimentado, muestran un comportamiento diferente con la XO. El DTNB no afecta a la actividad del enzima, mientras que el PCMB, la NEM y la IAM son inhibidores, si bien difieren en el carácter y en el tipo de inhibición que inducen.

Así la inhibición ejercida por el PCMB es pseudoirreversible, mientras que la provocada por la NEM y la IAM es reversible, y en todos los casos la inhibición no es progresiva.

Al caracterizar cinéticamente el tipo de la inhibición, se observan diferencias, así la ejercida por el PCMB es de tipo no competitivo puro lineal, la que provoca la NEM es competitiva e hiperbólica y la que induce la IAM es de tipo acompetitivo hiperbólico.

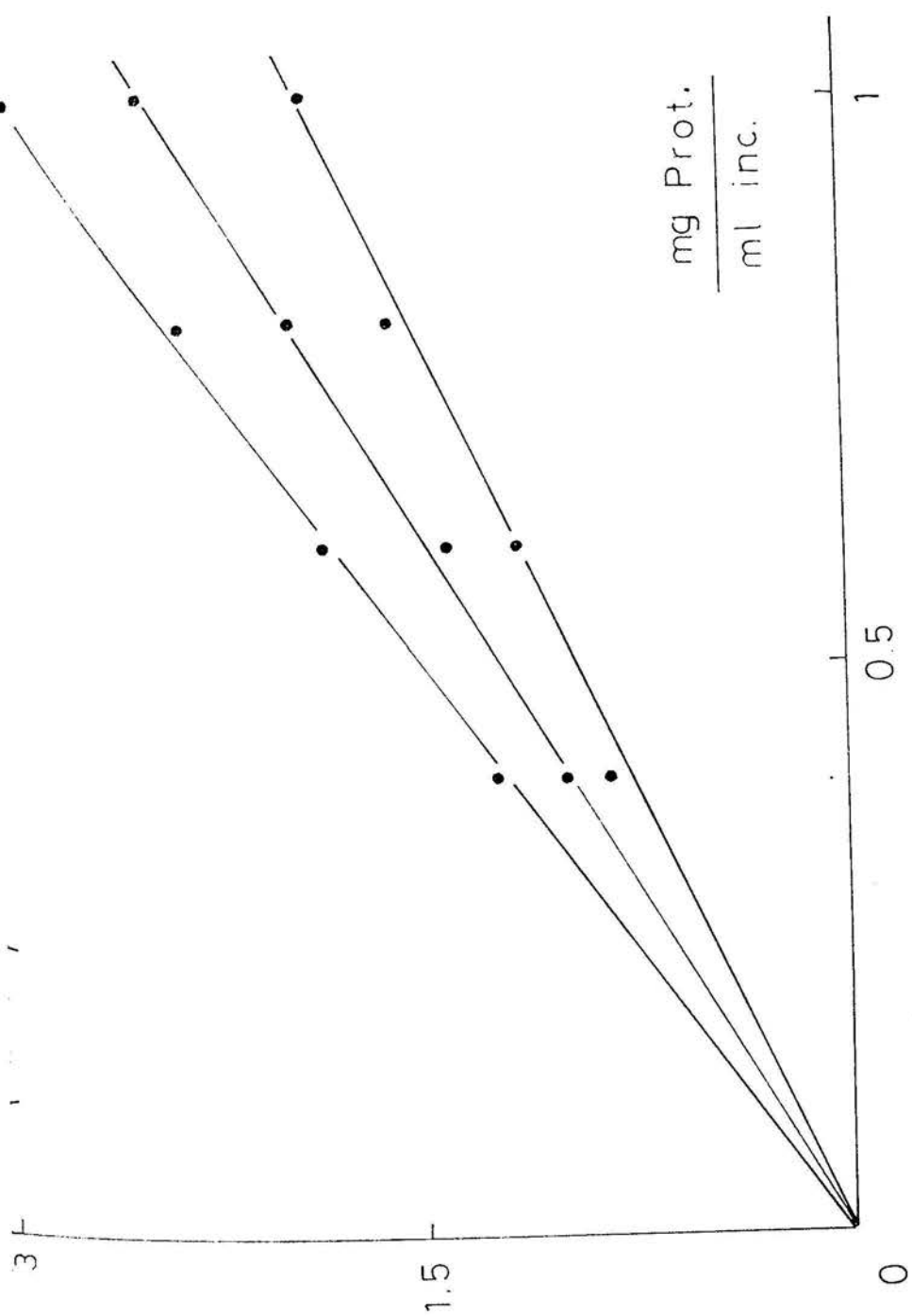


Fig. 12 Inhibición reversible por IAM de la XO (Saxantina- O_2 -XO-AC.URICO- H_2O_2)
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0 ; $[xantina] = 1 \times 10^{-4} M$;
 De abajo a arriba : $[IAM] \times 10^4 M^{-1} = 10 ; 1 ; 0$

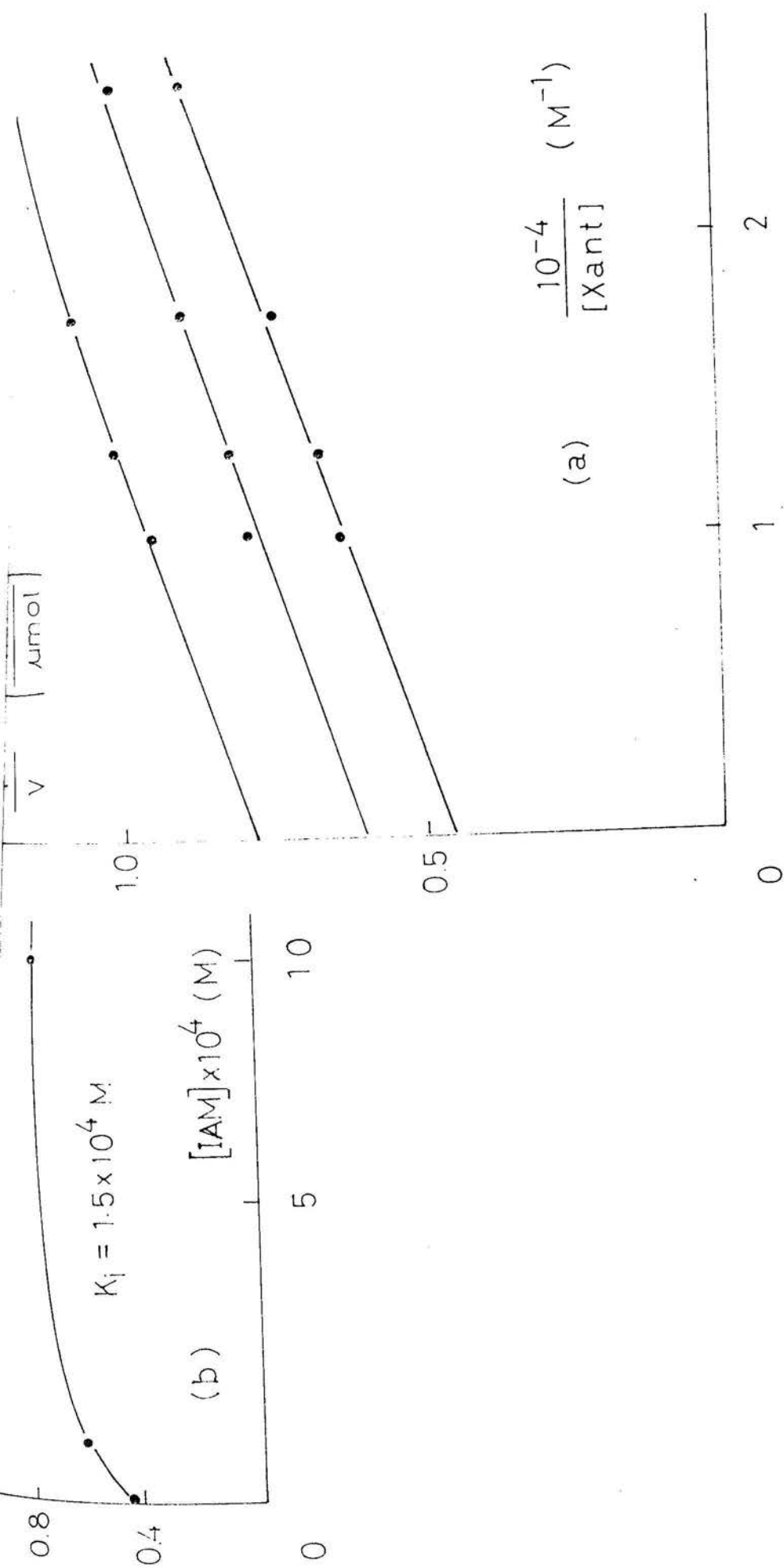


Fig. 13 Inhibición por IAM de la XO (Sa XANTINA-O₂-XO-AC.URICO-H₂O₂)
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0 ; [XO] = 0,4 U/ml
 (a) Representación de Lineweaver-Burck ; de abajo a arriba : [IAM] x 10⁴ M⁻¹ = 0 ; 1 ; 10
 (b) Representación secundaria de intersecciones correspondiente a la fig. 13 a

Los tipos de inhibición observados permiten postular la hipótesis de que cualquiera de los inhibidores ensayados no se une a la forma libre oxidada de la XO, en concordancia con lo sugerido para el enzima de otras procedencias.

Por otra parte, la unión de la NEM al enzima debería realizarse en el centro de éste al que se une la xantina. Tal adición sólo podrá ocurrir en alguna fase del proceso mecanístico, en la que el enzima no se halle en su estado inicial, es decir en la fase oxidada. El que el primer sustrato que se adiciona sea la xantina plantea una dificultad en la interpretación del mecanismo. Sólo podrá solventarse aquélla si se acepta que el enzima, que puede adicionar tres moléculas de xantina y liberar tres moléculas de ácido úrico por cada centro activo antes de su reducción completa y nueva oxidación por el aceptor electrónico (48), adicione la NEM cuando se encuentre en alguna de las fases intermedias de reducción ; es decir, cuando ya ha captado una molécula de xantina y liberado una de ácido úrico por lo menos (pudieran ser dos). Existen otras dos soluciones posibles. En efecto, el intermediario enzimático mecanístico posible que aparece cuando se ha liberado una molécula de ácido úrico podría unirse, bien a una molécula de NEM o bien, a una de xantina. Otra posibilidad es que el intermediario citado fuese reoxidado por el oxígeno que actúa como aceptor electrónico. Las suposiciones apuntadas, permiten formular la hipótesis de que la representación hiperbólica, que aparece pudiera ser debida a la probabilidad de existencia de los distintos caminos que pudieran seguir los intermediarios de reacción.

El distinto comportamiento inhibitorio de la IAM con respecto a la NEM, acompetitivo en vez de competitivo, puede explicarse si se admite que la unión de aquélla con la molécula del enzima se establece con una forma distinta de la que se une la xantina y además que ambas se hallan separadas por pasos irreversibles.

Es de esperar, que la unión de ambos inhibidores tenga lugar en el mismo centro, pero la IAM lo hará cuando ya se hayan li-

berado las tres moléculas de ácido úrico, con lo que se creará una irreversibilidad y el enzima, que se hallará totalmente reducido, ya no podrá fijar ninguna molécula de xantina.

Se ha sugerido, también que el reactivo provoca la alquilación de la flavina (38) (39) (40).

La unión con la flavina ocurrirá cuando el enzima se halle en estado reducido, lo que determinaría que la inhibición fuese de carácter acompetitivo, que es lo que ocurre en realidad. El que la representación secundaria de la inhibición sea una hipérbola, deberá indicar que el complejo de la forma enzimática con el inhibidor posee velocidad de reacción, si bien ésta será menor que la del enzima libre, ó bien que el enzima pueda aceptar al inhibidor o al aceptor electrónico al azar.

Las hipótesis formuladas precisan para su comprobación el empleo de otros métodos, principalmente el de EPR.

4.3.5 INHIBICION DE LA XDH POR PCMB

Al determinar la variación de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ con el pH en la XDH tanto para su actividad oxidásica como deshidrogenásica, aparece un punto de inflexión en la zona característica de los grupos sulfhidrilo o supersulfhidrilo, en concordancia con lo que se observa en la XO.

Se ha procedido, por tanto, a establecer los efectos que ejercen los reactivos de los grupos -SH sobre la actividad de la XDH.

En las experiencias se ha utilizado el purificado parcial de XDH, ya descrito (véase 3.2.2). En la determinación de las actividades se utilizaron concentraciones de 32 U/ml para la determinación de la actividad oxidásica y de 16 U/ml para la actividad deshidrogenásica. Las experiencias se efectuaron a $30^{\pm} 0,12C$, en medio de tampón de fosfato sódico 0,05 M, de pH 8.

En las experiencias de determinación de la actividad deshidrogenásica el sustrato fue xantina 1×10^{-4} M y el aceptor electrónico NAD^+ 1×10^{-3} M. Cuando se midió la actividad oxidásica se utilizó también xantina 1×10^{-4} M como sustrato, pero el aceptor electrónico fue el oxígeno disuelto en los incubados en las condiciones estandar de experimentación.

El PCMB inhibe ambas reacciones, siendo los porcentajes de inhibición análogos a los obtenidos en 4.3.1 con la XO. La inhibición de ambas actividades es completa cuando la concentración del PCMB es de 1×10^{-4} M.

La inhibición no progresa con el tiempo de contacto del enzima con el PCMB, a $30 \pm 0,12^\circ\text{C}$, aún después de intervalos tan prolongados como 200 min.

4.3.5.1 Carácter de la inhibición ejercida por el PCMB sobre las actividades de la XDH

Se ha procedido a determinar el carácter reversible o irreversible de la inhibición provocada por el PCMB sobre las actividades, deshidrogenásica y oxidásica, de la XDH.

Los resultados obtenidos aparecen en la fig. 14 a y 14 b, en ellas se pone de manifiesto, quella inhibición de ambas actividades por PCMB, no es reversible en las condiciones de experimentación.

4.3.5.2 Reversibilidad por diálisis de la inhibición inducida por el PCMB sobre las actividades de la XDH

El que la inhibición que provoca el PCMB sobre la XDH, se muestre de carácter no reversible, puede significar, que sea irreversible ó pseudoirreversible. Se ha determinado dicho carácter sometiendo a diálisis muestras del enzima que habían sido pre-

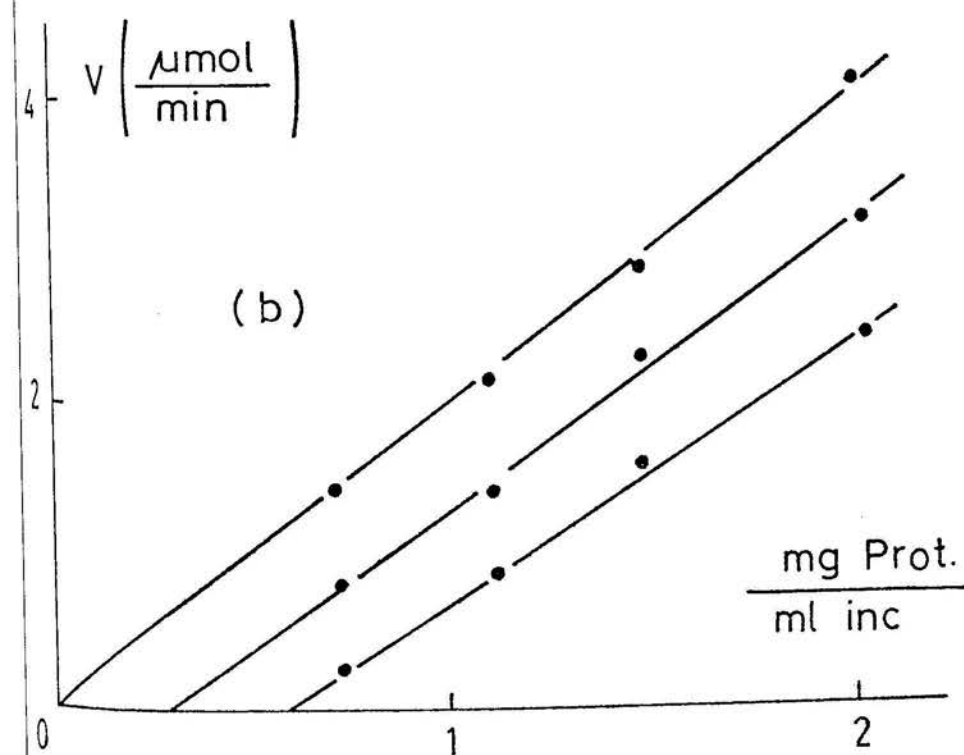
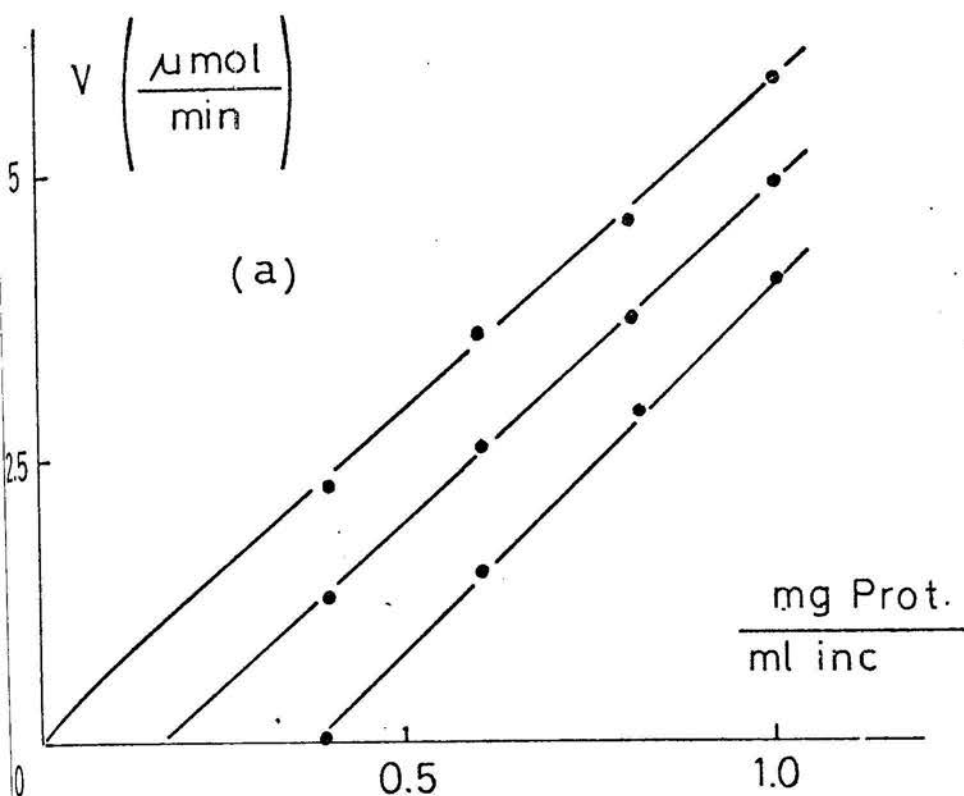


Fig. 14 Inhibición por PCMB de la XDH ; Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8 ; de abajo a arriba $[PCMB] \times 10^7 M^{-1} = 10; 8; 0$
 (a) Sa XANTINA- NAD^+ -XDH-AC.URICO- $NADH$; xantina $= 1 \times 10^{-4} M$
 $[NAD^+] = 1 \times 10^{-3} M$
 (b) Sa XANTINA- O_2 -XDH-AC.URICO- H_2O_2 ; [xantina] $= 1 \times 10^{-4} M$

incubadas con PCMB.

Las muestras en las que se había de efectuar la determinación de la actividad deshidrogenásica contenían 8 U/ml de incubado y las destinadas a la determinación de la actividad oxidásica 16 U/ml. La concentración de PCMB fue en ambos casos de 2×10^{-6} M. El intervalo de contacto entre el PCMB y la XDH se prolongó durante 30 min. a $30 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, al cabo de los cuales se dializaron las muestras frente a tampón de fosfato sódico 0,05 M de pH 8.

En todos los casos las actividades de las muestras incubadas con PCMB, se mostraron análogas a las halladas para las correspondientes muestras control en ausencia del citado reactivo inhibidor.

Los resultados permiten afirmar que la inhibición que provoca el PCMB sobre ambas actividades del enzima es de carácter pseudoirreversible.

4.3.5.3 Cinética de la inhibición inducida por el PCMB sobre las actividades de la XDH

El que la inhibición que ejerce el PCMB sobre las actividades enzimáticas de la XDH, sea irreversible cinéticamente, implicará que el tipo de inhibición sea no competitivo de carácter lineal, al igual que ocurría con la XO.

Los resultados obtenidos aparecen en las fig. 15 y 16, y confirman el tipo de inhibición que se postula.

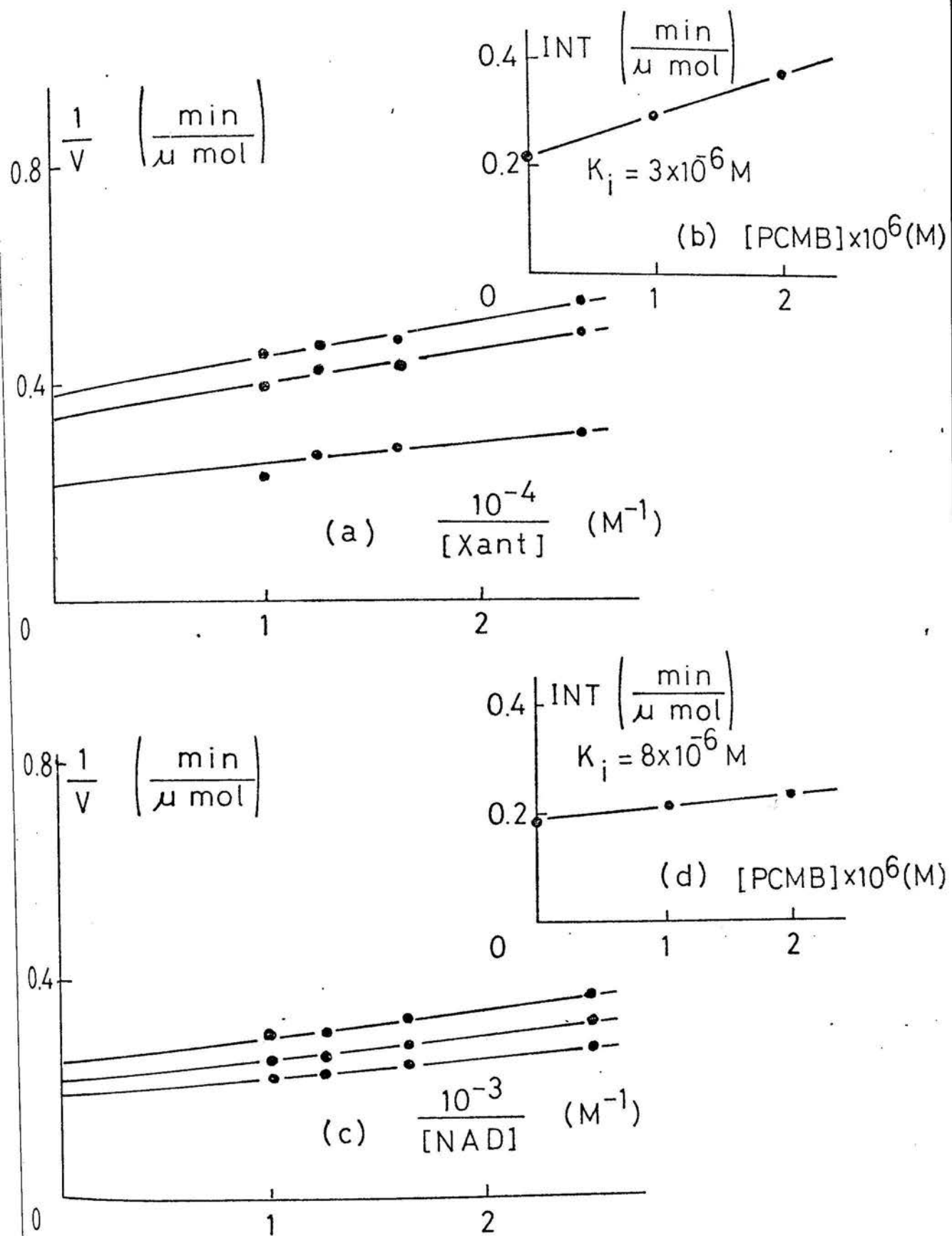


Fig. 15 Inhibición por PCMB de la XDH (S^a XANTINA-NAD⁺-XDH-AC. URICO-NADH); tampón fosfato sódico 50 mM pH 8 ; XDH 16U/ml
 (a) Representación de Lineweaver-Burck respecto a la xantina; de abajo a arriba $[\text{PCMB}] \times 10^6 \text{ M}^{-1} = 0; 1; 2$; $[\text{NAD}^+] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$
 (b) Representación secundaria de intersecciones fig.15a
 (c) Representación de Lineweaver-Burck respecto al NAD⁺; de abajo a arriba $[\text{PCMB}] \times 10^6 \text{ M}^{-1} = 0; 1; 2$; $[\text{xantina}] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$
 (d) Representación secundaria de intersecciones fig.15c

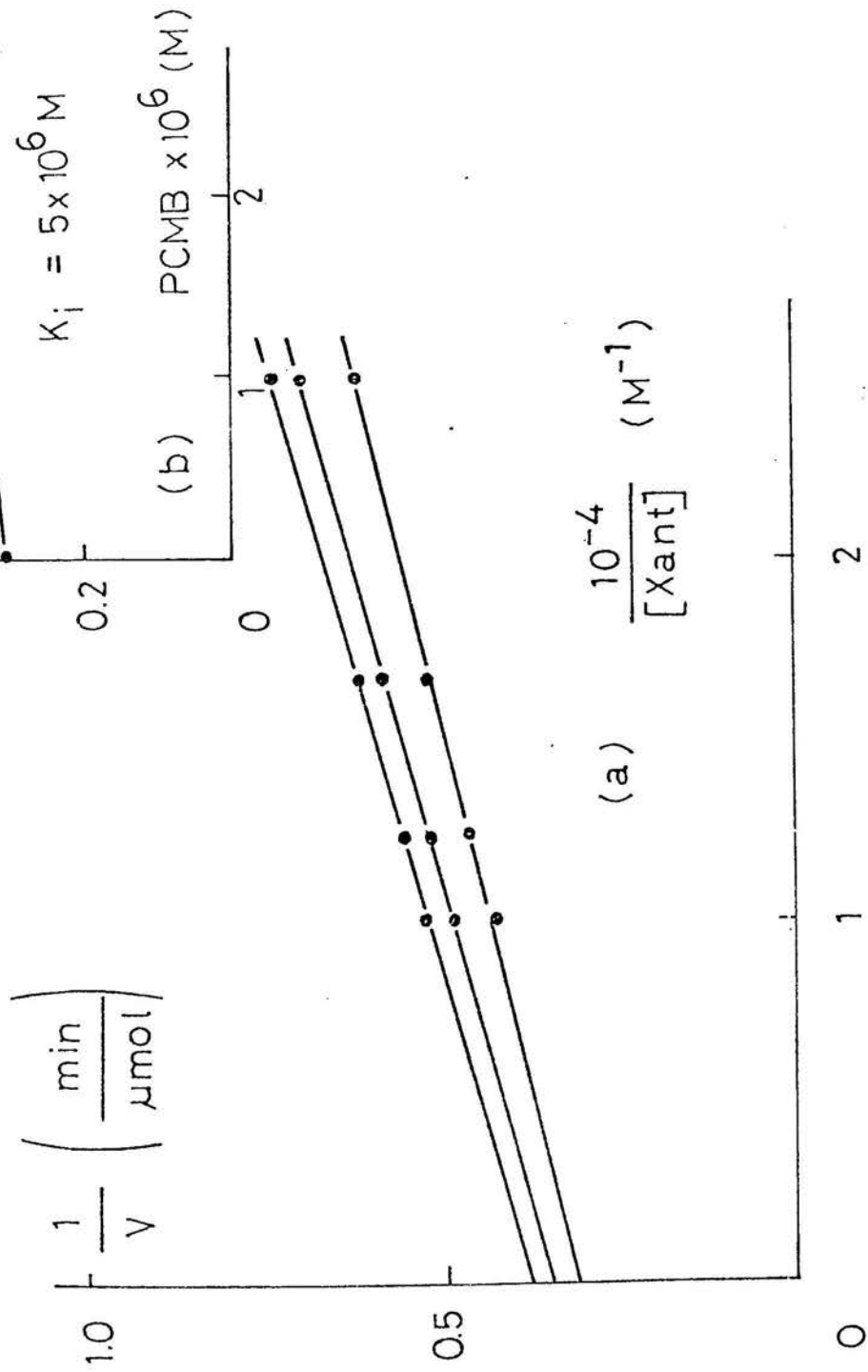


Fig. 16 Inhibición por PCMB de la XDH (Sa XANTINA- O_2 -XDH-AC.URICO- H_2O_2)
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8 ; $[\text{XDH}] = 32 \text{ U/ml}$; de arriba a arriba $[\text{PCMB}] \times 10^6 \text{ M}^{-1} = 0; 1; 2$

(a) Representación de Lineweaver-Burck

(b) Representación secundaria de intersecciones correspondientes a la fig. 16 a

4.3.6

INHIBICION DE LA XDH CON DTNB, NEM Y IAM

Mediante la utilización de las condiciones experimentales descritas en 4.3.5, se procedió a estudiar el efecto inhibitorio que los restantes reactivos de grupos -SH, ensayados para la XO, ejercían sobre las actividades oxidásica y deshidrogenásica de la XDH.

Los resultados de estas experiencias aparecen en la tabla XVIII.

T A B L A XVIII

INHIBICION DE LAS ACTIVIDADES DE LA XDH POR DTNB, NEM Y IAM

Reactivo	Concentración (M)	% Inhibición	
		act.oxidásica	activ.deshidrogenásica
DTNB	1×10^{-4}	2	5
DTNB	3×10^{-4}	5	9
NEM	1×10^{-6}	5	-
NEM	5×10^{-5}	28	-
NEM	1×10^{-3}	95	-
IAM	1×10^{-5}	8	-
IAM	1×10^{-3}	40	-

$[XDH]_{\text{oxidásica}} = 32 \text{ U/ml}$; $[XDH]_{\text{deshidrogenásica}} = 16 \text{ U/ml}$;

$[xantina] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[NAD^+] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$; tampón fosfato sódico
50 mM pH 8 ; $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

En ningún caso el efecto que los reactivos provocan en las actividades enzimáticas viene afectado por el tiempo de contacto entre éstos y el enzima.

Estos resultados llevan a establecer una diferencia importante en cuanto al comportamiento de la XDH, cuando se trata de la ac

tuación con el oxígeno como aceptor electrónico o bien, con el NAD^+ .

Los reactivos de grupos -SH con los que se ha experimentado, se comportan de forma análoga con el enzima de procedencia bovina y con el de pollo, cuyas actividades oxidásicas inhiben.

Por el contrario, la actividad de la XDH no se ve afectada por los mencionados reactivos.

La diferencia quizá pueda ser debida a que la presencia del NAD^+ , impide la fijación del inhibidor, para dar lugar al complejo enzima-inhibidor, ya que la fijación del NAD^+ tiene lugar en el grupo flavínico, y dado que la fijación de la IAM tiene lugar en el mismo grupo, se debe suponer que la unión del NAD^+ evita la fijación del inhibidor (38) (39) (40) (véase 4.3.4.2).

Por otra parte, parece probable que el NAD^+ , intervenga en la secuencia mecanística antes de que lo haga el oxígeno, cuando éste actúa como aceptor electrónico ; es decir, que no tengan lugar los tres pasos que caracterizan a la adición del sustrato xantina en la reacción oxidásica, sino que el aceptor electrónico interaccione con el enzima una vez se ha liberado la primera molécula de sustrato.

Igualmente existe la posibilidad que el NAD^+ , sea capaz de actuar de modificados de la estructura enzimática, uniéndose en primer lugar al enzima.

Las hipótesis formuladas pueden encontrar su confirmación en posteriores estudios cinéticos (véase más adelante).

4.4

INTERCONVERSION DE LA ACTIVIDAD OXIDASICA Y DESHI-DROGENASICA

El problema que se abordó a continuación, fue el de intentar transformar el enzima de forma que en el caso de que su actividad de origen fuese oxidásica, éste catalizase reacciones utilizando el NAD^+ como aceptor electrónico, y que cuando su actividad predominante fueses la deshidrogenásica, se consiguiese disminuir ésta en beneficio de la oxidásica. Un ejemplo de la primera es la XO y de la segunda la XDH, las cuales han sido objeto de los pertinentes tratamientos en el presente trabajo.

La interconversión de las actividades ha sido objeto de estudio y se ha intentado demostrar la aditividad de las actividades oxidásica y deshidrogenásica cuando ambas coexisten (51). Otros autores (52) (53) (54) (55) (56) (57), tratando xantideshidrogenasa de hígado de rata recién preparada, con distintos reactivos (véase 1.4) provocan la aparición de actividad oxidásica, y lo mismo ocurre cuando el enzima se conserva a -20°C . Estas transformaciones son impedidas por la presencia del DTE o del DTT. Asimismo los dos mercaptidos anteriormente citados se muestran capaces de invertir el proceso, esto es devolver la actividad deshidrogenásica al enzima que había sido transformado previamente en oxidasa. Estos resultados son idénticos a los obtenidos por los mismos autores (loc. cit.) con la xantinoxidasa de hígado humano ; con el enzima de hígado de pollo no obtuvieron resultados positivos.

4.4.1

EFEECTO DEL 2-ME SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA XO

En primer lugar se determinó la actividad oxidásica que poseían distintos homogeneizados de hígado de buey, a pH 8 en tampón de fosfato sódico, obtenidos tal como se indica en 4.1.2 ; se diluyeron en la proporción 1/3 para efectuar incubaciones, cuando el aceptor electrónico utilizado fue el oxígeno. Los homogenei-

zados carecen de actividad cuando el aceptor electrónico utilizado era el NAD^+ .

El 2-ME hasta 10^{-2} M, no afecta la actividad oxidásica de la XO (véase 4.3.1.3).

El NAD^+ presente en el medio de reacción únicamente actúa como inhibidor de la reacción oxidásica, si el enzima adquiere actividad deshidrogenásica se reduciría a NADH.

Se incubaron, a pH 8 y $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de homogeneizado (0,06 g/ml), con 2-ME (10^{-4} a 10^{-2} M), durante intervalos comprendidos entre 5 min. y 1 h, y la actividad se determinó frente a xantina 10^{-4} M. Las muestras incubadas o no con 2-ME no exhiben diferencias de actividad y ello es indicio de que el tiol no induce aparición de actividad deshidrogenásica.

Al efectuar las anteriores experiencias en anaerobiosis tampoco se observó que el 2-ME indujera acción alguna.

En otra serie de experiencias las muestras mencionadas, que habían sido incubadas con 2-ME (10^{-4} a 10^{-2} M) se sometieron a diálisis durante 20 h, en presencia de carbón activo y después se determinó la actividad oxidásica y la posible actividad deshidrogenásica; esta última tampoco es perceptible.

La interconversión parcial de la xantinoxidasa de hígado de rata en deshidrogenasa llegó a considerar la posibilidad de que el enzima se halle en estado nativo, en esta última forma y que experimenta alteraciones a lo largo de su proceso de aislamiento, que la transformen en oxidasa.

En el proceso de purificación de la XO, el contacto con el medio ambiente, así como los distintos tratamientos a los que se somete para obtenerla con alto grado de pureza quizá pudiesen inducir cambios en la molécula enzimática que provocarían la pérdida de la actividad catalítica con el NAD^+ como aceptor electrónico.

Con objeto de comprobar la hipótesis, se efectuaron purificaciones paralelas, una en las condiciones habituales (véase 4.1) y otra en la que se efectuaron todos los tratamientos en presencia de 2-ME (5×10^{-2} M). A lo largo de ambos procesos de purificación, se determinaron las distintas actividades, en ausencia y en presencia de NAD^+ .

En la purificación en presencia de reactivo tóxico se puso de manifiesto una pérdida de un 20% de la actividad con respecto a la correspondiente purificación control. El purificado final que se obtiene en presencia de 2-ME es de un color verde amarillento, claramente diferenciado de la coloración ocre del que se obtiene en ausencia del tiol.

Los resultados obtenidos con el 2-ME indican que en las condiciones ensayadas el reactivo, se muestra incapaz de provocar las alteraciones necesarias en la molécula de la xantioxidasa de hígado de buey, que induzcan la actividad catalítica con el NAD^+ como aceptor electrónico.

4.4.2 EFECTO DEL NaHSO_3 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA XO

Se efectuaron estudios con distintas concentraciones de NaHSO_3 (1×10^{-5} M a 1×10^{-3} M) a pH 7,4 en tampón de fosfato sódico a $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Cuando se determina la actividad oxidásica en presencia del reactivo y xantina 1×10^{-4} M se observa una inhibición del 30% (para concentración del reductor 10^{-4} M).

Si la experiencia se efectúa además en presencia de NAD^+ , 1×10^{-3} M, se observa un incremento de la inhibición del 50% superior a la obtenida en ausencia de éste.

En ningún caso se pudo observar la aparición de actividad deshidrogenásica, mostrándose este reactivo incapaz de inducir modificaciones adecuadas en la molécula del enzima para la aparición de ésta.

4.4.3 EFECTO DEL DTT Y DEL DTE SOBRE LA XO

El DTE y el DTT son reactivos de carácter reductor que se muestran capaces de impedir la transformación de deshidrogenasa en oxidasa e incluso reconvertir la oxidasa transformada en deshidrogenasa, cuando se trata de xantinoxidasa humana y de rata (52) (53) (54) (55) (56) (57), aunque han postulado los citados autores, que los citados enzimas actúan preferentemente como deshidrogenasas "in vivo".

Se describen a continuación los efectos que ambos reactivos provocan sobre la actividad oxidásica del enzima y la posible inducción de actividad deshidrogenásica.

4.4.3.1 Efecto del tiempo de contacto de la XO con DTE o DTT

En primer lugar, se procedió a establecer las modificaciones, que sobre la actividad oxidásica y su conversión en deshidrogenásica, provocaba el tiempo de contacto de la XO con los reactivos reductores, DTE y DTT.

Las muestras en incubación contenían 2,4 U de XO/ml de incubado en contacto con DTE (DTT) 0,15 M. Ambas actividades se determinaron a pH 8 y $30 \pm 0,12^\circ\text{C}$ y se mantuvieron durante intervalos variables de tiempo en contacto con el reductor ; las concentraciones de xantina y NAD^+ utilizadas fueron 10^{-4} y 10^{-3} M respectivamente, éste último únicamente cuando se determinó la actividad deshidrogenásica.

Se efectuó un ensayo de control en el que se adicionó el reductor en la concentración adecuada al iniciarse la determinación de la actividad enzimática ; es decir sin contacto previo entre el enzima y el reactivo.

En las determinaciones de actividad se utilizaron las cantidades adecuadas de los correspondientes incubados para que las concentraciones en presencia del sustrato fuesen 0,2 U de XO/ml y $3,75 \times 10^{-2}$ M de DTE (DTT).

Los resultados obtenidos indican que ni la presencia de reductor en el medio, ni intervalos de contacto entre éste y el enzima de hasta 150 min inducen variaciones en la actividad oxidásica del enzima, la cual se mantiene constante e igual a la determinada en ausencia de reductor.

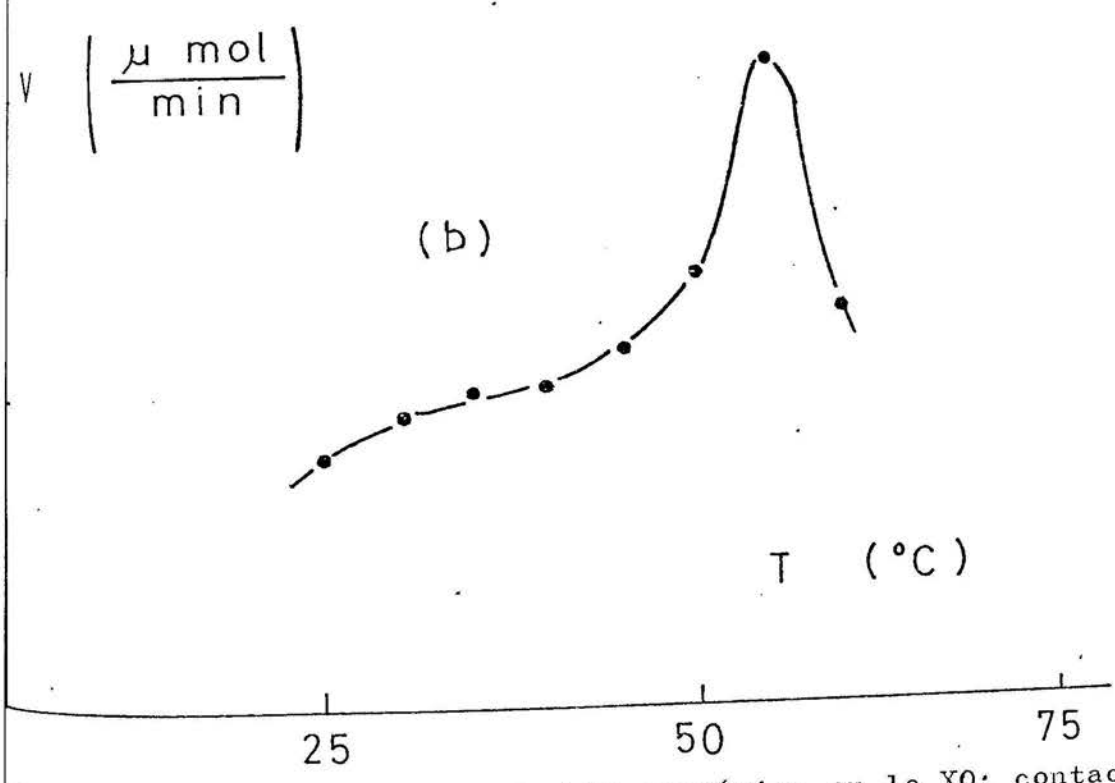
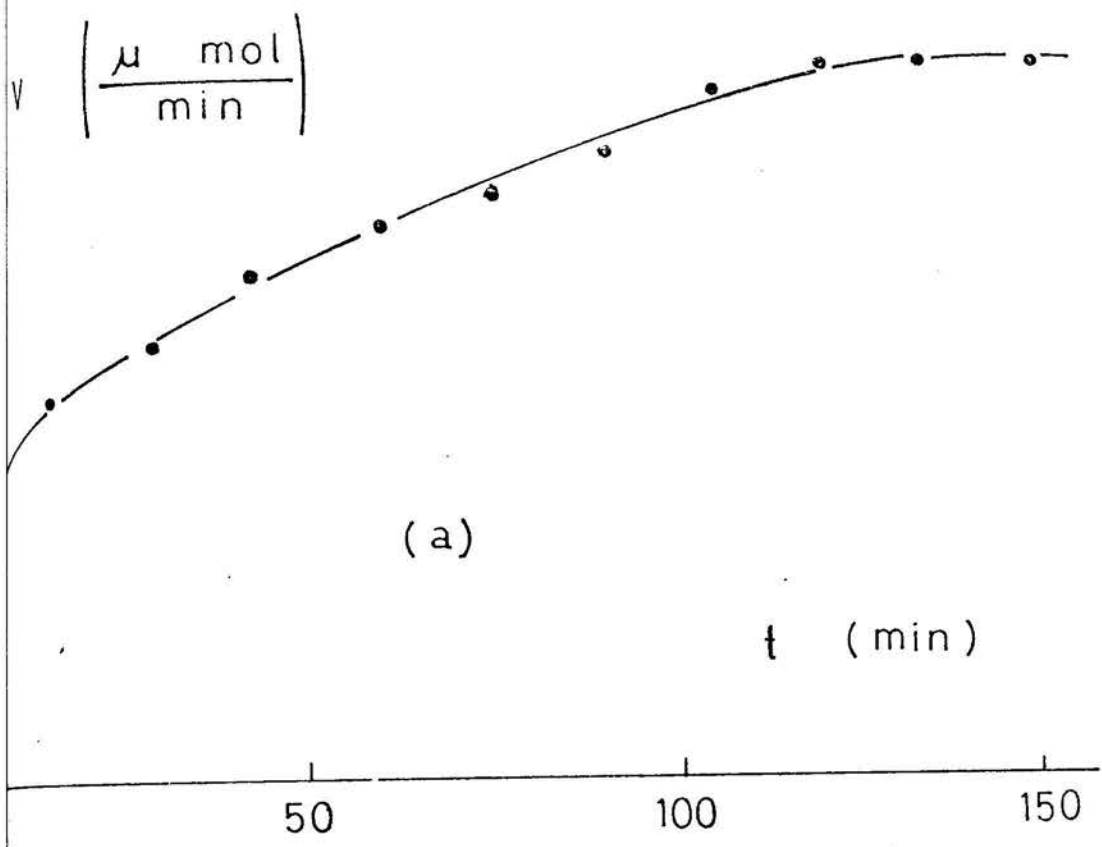
Al determinar las actividades oxidásica y deshidrogenásica en presencia de NAD^+ , se observa que la primera decrece y que la segunda experimenta un incremento que es máximo a los 120 min. de incubación y se mantiene constante hasta los 150 min. a partir de los cuales comienza a descender. La actividad oxidásica presenta un mínimo en las muestras preincubadas durante 120 min.

Los resultados cualitativos inducen a pensar que ambas actividades sean aditivas, pero la observación de los valores cuantitativos, como puede observarse en la fig. 17, no confirman la suposición.

4.4.3.2 Efecto de la temperatura en el contacto de la XO con DTE o DTT

Se ha determinado el efecto que ejerce la temperatura en la inducción por DTE o DTT de la actividad deshidrogenásica en la XO.

Las muestras que contenían XO y uno de los reactivos inductores, se mantuvieron durante intervalos de tiempo constantes (10 min) a temperaturas crecientes. Al cabo del intervalo de tiempo, se determinaron las actividades oxidásica y deshidrogenásica del modo habitual a la temperatura de $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



17 Inducción de actividad deshidrogenásica en la XO; contacto previo $[XO]=0,8$ U/ml y $[DTE]=0,15$ M ; tampón fosfato sódico 50 mM pH 8. Cubeta de reacción: $[XO]=0,2$ U/ml y $[DTE]=3,75 \times 10^{-2}$ M ; $[xantina]=1 \times 10^{-4}$ M ; $[NAD^+]=1 \times 10^{-3}$ M.

(a) Efecto del tiempo de contacto XO y DTE (a $30 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$)

(b) Efecto de la temperatura de incubación (contacto XO y DTE 30 min.)

Los resultados obtenidos aparecen en la fig. 17. El valor máximo de actividad deshidrogenásica, inducida por ambos reactivos, aparece cuando el enzima se preincuba a 55°C ; a temperaturas superiores, ambas actividades, la oxidásica y la deshidrogenásica, decrecen rápidamente.

El aumento de la actividad deshidrogenásica es correlativo con el descenso de la actividad oxidásica, si bien las variaciones de ambas no son equivalentes cuantitativamente.

4.4.3.3 Concentraciones óptimas de DTE o DTT que inducen actividad deshidrogenásica en la XO

El efecto que ejerce la concentración de DTE o DTT sobre la inducción de actividad deshidrogenásica en la XO, se ha establecido preincubando durante 30 min, a 30±0,1°C, mezclas que contenían el enzima y concentraciones variables de los reactivos. Al final del intervalo se vertieron las cantidades adecuadas de la mezcla en la cubeta espectrofotométrica conteniendo los sustratos hasta un volumen final de 3 ml.

Se determinaron las actividades oxidásica y deshidrogenásica en la forma acostumbrada. Los resultados obtenidos aparecen en la fig. 18. Se observa que la actividad deshidrogenásica es máxima cuando la concentración de los reactivos reductores es de $1,5 \times 10^{-2}$ M.

4.4.3.4 Actividad deshidrogenásica de la XO después de eliminar los reactivos DTE o DTT por diálisis

Con objeto de determinar si la actividad deshidrogenásica inducida en la XO, persiste después de eliminar los reactivos causantes de la transformación, se efectuaron una serie de experiencias en las que se preparan distintas muestras, que contienen 4,8 U de XO/ml y DTE (DTT) 9×10^{-2} M. Se preincubaban durante

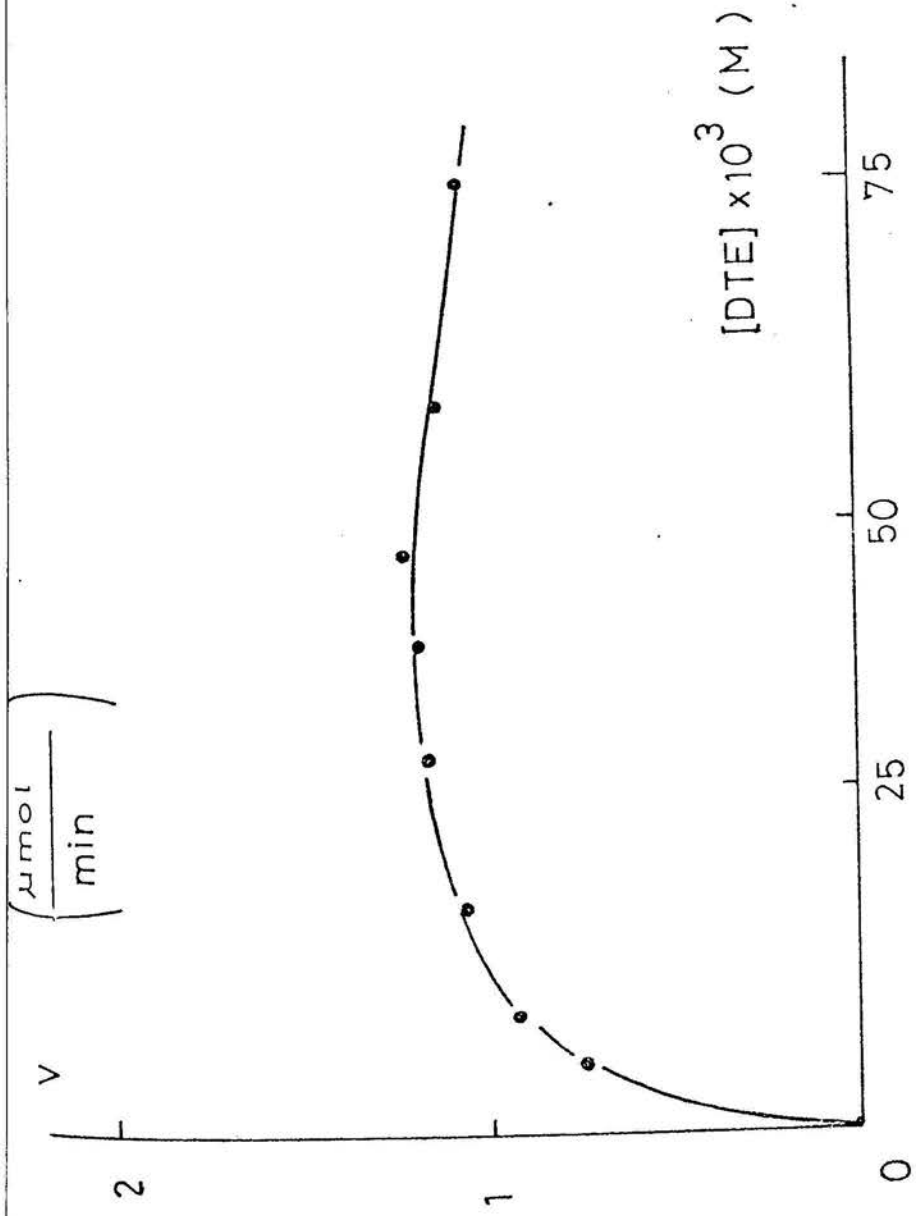


Fig. 18 Inducción de actividad deshidrogenásica en la XO.
 Contacto XO y DTE : 30 min. a 30±0,1°C ; tampón de fosfato sódico 50 mM
 pH 8. [XO] contacto = 0,8 U/ml.
 En cubeta de reacción: [xO]= 0,2 U/ml ; [xantina] = 1x10⁻⁴ M ; [NAD⁺] = 1x10⁻³ M

30 min. a 30°C , 1°C y al final del intervalo se dializaron las muestras a 4°C frente a una disolución del mismo tampón utilizado (fosfato sódico 0,05 M pH 8) que era a la vez 0,14 M en 2-ME como agente preventivo de la oxidación. Se confeccionaron los correspondientes blancos en ausencia del reductor y asimismo, se efectuaron experiencias paralelas de diálisis en ausencia de 2-ME en la disolución frente a la que se efectúa aquélla.

Una vez finalizada la diálisis, se diluyeron las muestras hasta un volumen total adecuado para que la concentración enzimática fuese de 2,4 U/ml de disolución. A partir de éstas se efectuaron las determinaciones de actividad tomando 1 ml de la disolución final que se diluyó en la cubeta de reacción hasta un volumen de 3 ml en las condiciones habituales.

Asignando un valor de actividad 100 a la actividad oxidásica en ausencia de NAD^+ , se obtuvieron los resultados comparativos que se muestran en la tabla XIX.

T A B L A XIX

ACTIVIDAD DE LAS MUESTRAS DIALIZADAS

Muestra	Actividad en ausencia de NAD^+	En presencia de NAD^+	
		Act.oxi- dásica	Act.deshidro- genásica
sin diálisis	100	14	52
diálisis 24 h	86	6	38
diálisis 48 h	57	4	38

Los resultados anteriores muestran claramente que los valores de la actividad oxidásica en ausencia de NAD^+ no corresponden a la suma de los valores de la actividad oxidásica en presencia de NAD^+ y de la actividad deshidrogenásica. Por otra parte,

la aparición de la actividad deshidrogenásica no ha determinado la desaparición de la actividad oxidásica. Se observa también, que la actividad deshidrogenásica inducida es más estable que la actividad oxidásica residual, a lo largo del tiempo.

4.4.3.5 Parámetros cinéticos reales en la actividad deshidrogenásica inducida en la XO por DTE

Una vez obtenida y determinada la presencia de actividad deshidrogenásica inducida en la XO, se procedió a la determinación de sus parámetros cinéticos más característicos. Se emplearon en las determinaciones muestras de XO de 2,4 U/ml que se incubaron durante 30 min a 30±0,1°C a pH 8, en tampón de fosfato sódico 0,05 M, que eran a la vez 0,15 M en DTE. En la cubeta espectrofotométrica, se vertieron 0,5 ml de la disolución así obtenida, sobre los volúmenes de xantina y de NAD^+ , completando un volumen de 3 ml.

En las fig. 19 y 20 aparecen los resultados obtenidos en las determinaciones de las velocidades iniciales. La representación gráfica de las inversas de las concentraciones de xantina y de NAD^+ frente a las inversas de las velocidades iniciales, conducen a la obtención de rectas paralelas, lo que es característico de los mecanismos ping-pong e indica la ausencia de complejos ternarios.

La representación secundaria de Vestling-Florini a partir de estos datos permitió el cálculo de los parámetros reales.

4.4.4 EFECTO DE LAS PROTEASAS SOBRE LA XDH

Establecida la posibilidad de inducción de actividad deshidrogenásica en la XO ; esto es a partir de un enzima incapaz de transformar la xantina a ácido úrico utilizando el NAD^+ como

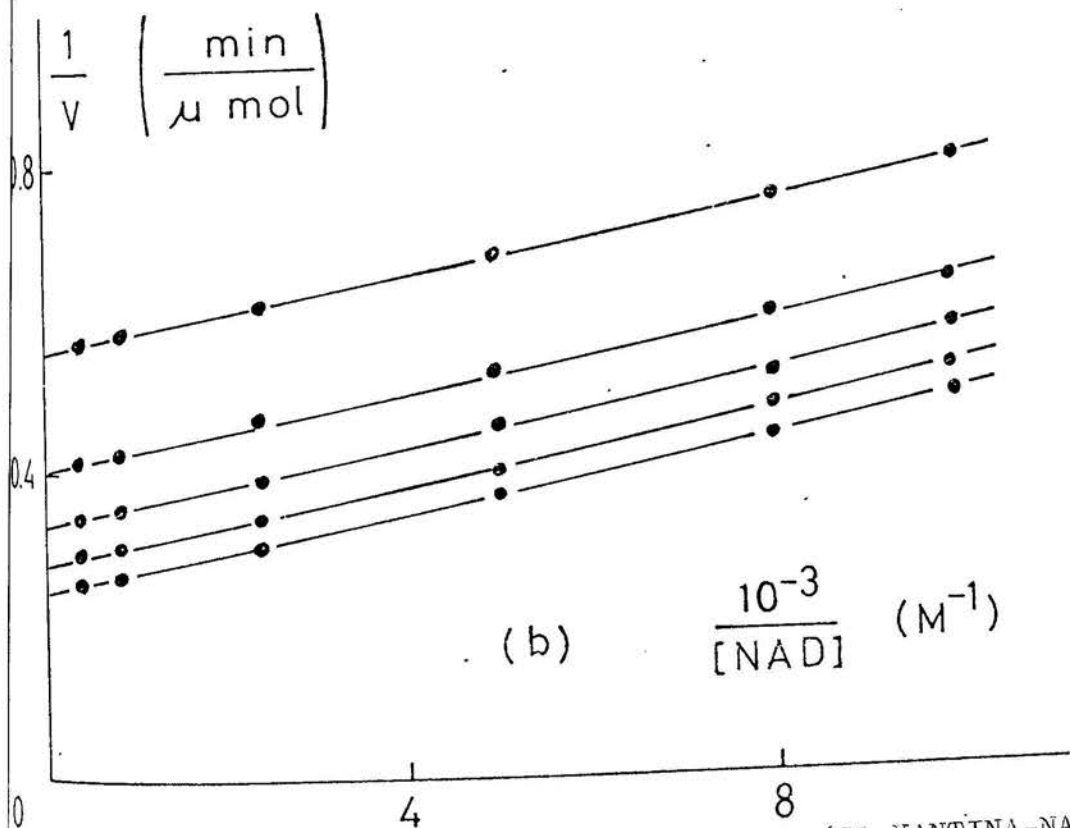
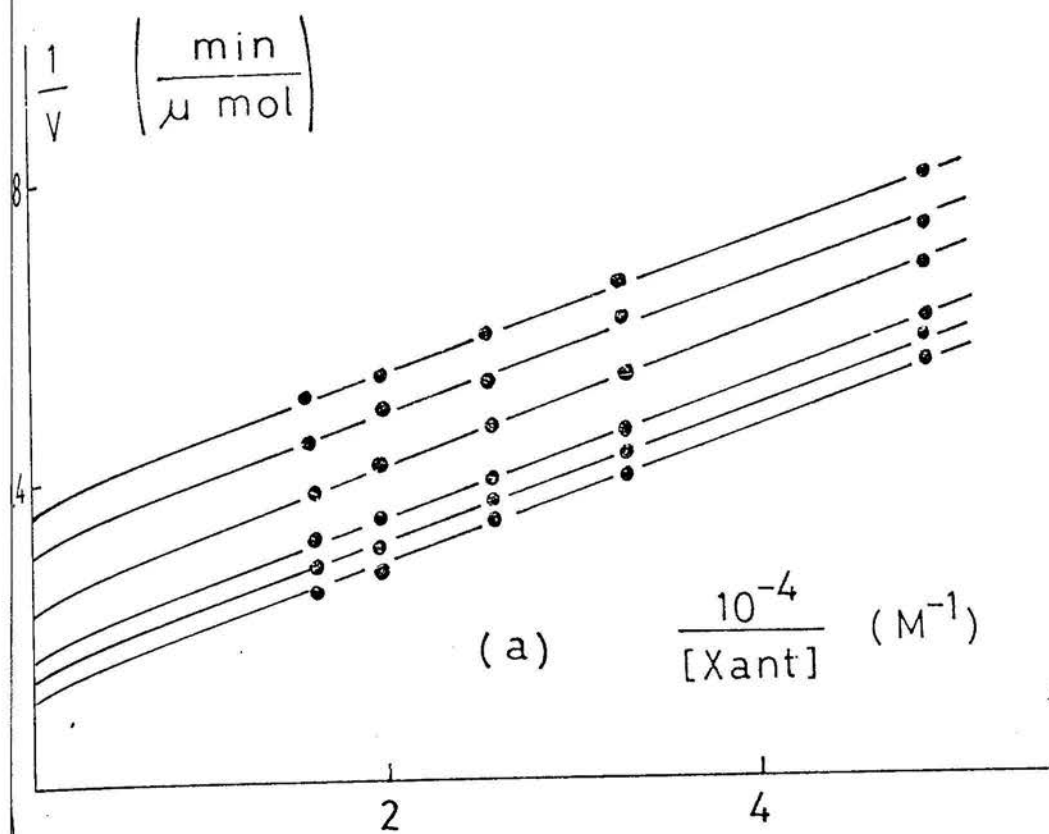


Fig. 19 Representación de Lineweaver-Burck (Se XANTINA-NAD⁺-XO-
 -AC.URICO-NADH). Contacto previo [XO] = 0,8 U/ml y [DTE] = 0,15M
 30 min a 30±0,1°C tampón fosfato sódico 50 mM pH 8 En cu-
 beta de reacción [XO] = 0,13 U/ml ; [DTE] = 2,5x10⁻²M.
 (a) Respecto a la xantina ; de abajo a arriba: [NAD⁺] × 10⁴M⁻¹ =
 20; 10; 4; 2; 1,25; 1
 (b) Respecto al NAD⁺ ; de abajo a arriba: [xantina] × 10⁵M⁻¹ =
 6; 5; 4; 3; 2

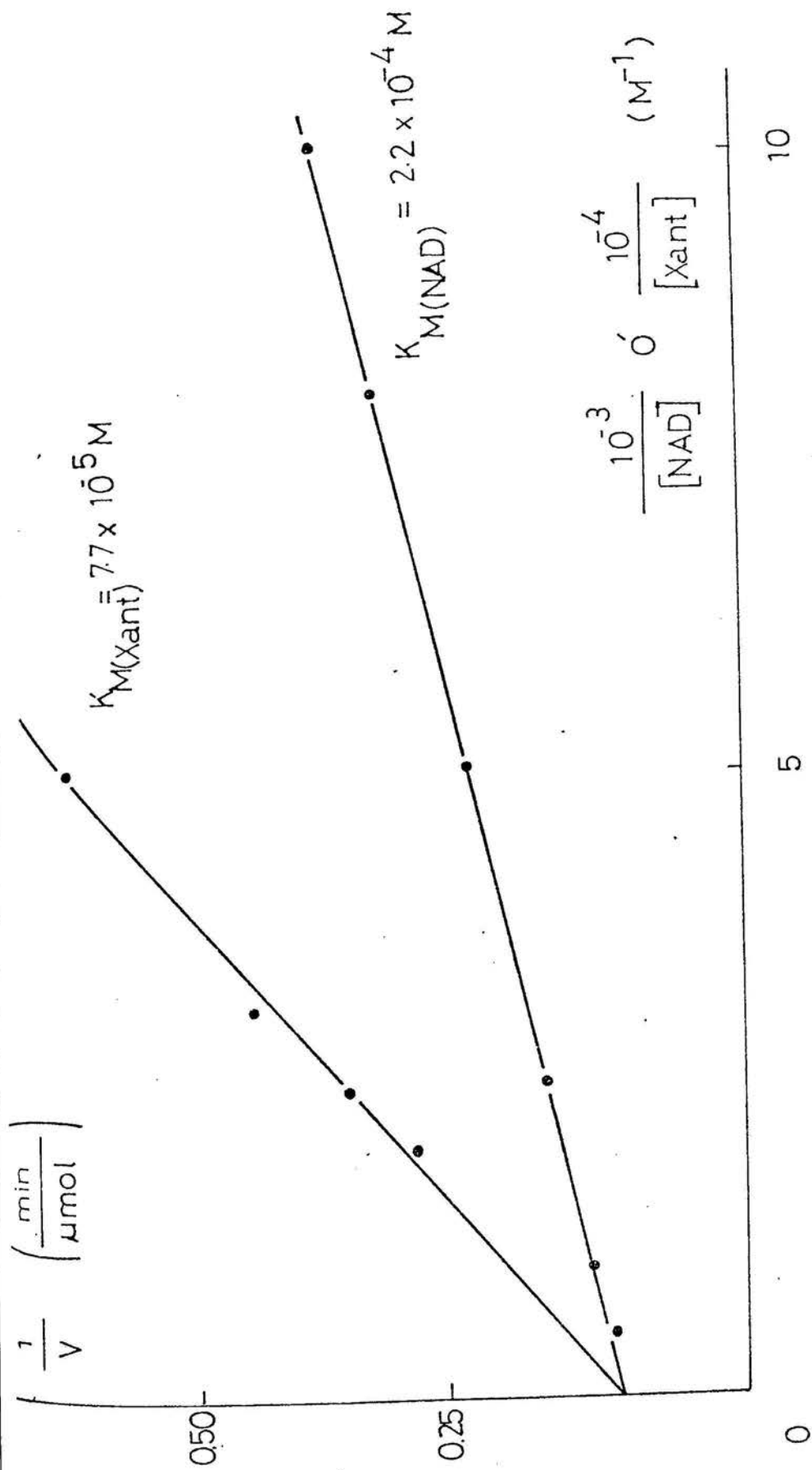


Fig. 20 Representación de Vestling-Florini correspondiente a la fig. 19 a y 19 b

aceptor electrónico, obtener uno capaz de utilizarlo, se procedió a intentar inducir en la XDH que es una deshidrogenasa clásica, y cuya capacidad de utilizar el oxígeno como aceptor electrónico es bastante inferior a la del NAD^+ , un aumento de la capacidad de utilización del oxígeno como tal aceptor.

Para determinar la acción de las proteasas sobre la XDH se incubaron las muestras que contenían 80 U de XDH/ml de disolución durante intervalos de hasta 30 min. La disolución enzimática se incubó a pH 7 con tripsina y α -quimotripsina (hasta 10 /ml) y con subtilisina (hasta 1,5 mg/ml).

Una vez finalizada la acción proteolítica se determinó la actividad oxidásica y la deshidrogenásica en muestras que contenían 5,3 U/ml y 10,6 U/ml respectivamente frente a xantina 1×10^{-4} M y NAD^+ 1×10^{-3} M cuando hubo lugar, en medio de tampón de fosfato 0,05 M de pH 8.

No se ha podido observar que el tratamiento con las proteasas citadas induzca variación alguna en las actividades oxidásica y deshidrogenásica de la XDH.

4.5

ESTUDIOS CINÉTICOS DE LA XO

Una vez establecidas las diferencias de comportamiento frente a los distintos reactivos de los grupos SH, entre la XO y la XDH, así como la transformación de aquella para dar lugar a un enzima con actividad deshidrogenásica, se han determinado las analogías y las diferencias más significativas en el mecanismo cinético de ambas enzimas, procediendo para ello a efectuar la caracterización cinética de la forma más completa posible.

El estudio cinético de la XO, se ha efectuado con la hipoxantina y la xantina como sustratos de las distintas reacciones que el enzima cataliza. Como aceptor electrónico, se ha utilizado el oxígeno, cuya concentración se ha mantenido constante y saturante a la temperatura de experimentación ($30 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) ; como se recordará el NAD^{+} no actúa como aceptor electrónico de la XO.

4.5.1 DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE ACTUACION DE LA XO
CON LA XANTINA COMO SUSTRATO

Se consideró inicialmente el estudio de la reacción de oxidación de la xantina a ácido úrico por medio de la XO, que utiliza el oxígeno como aceptor electrónico al que reduce a peróxido de hidrógeno.

La determinación del pH óptimo, se llevó a cabo por dilución de las correspondientes muestras de sustrato y de enzima a pH requerido, inmediatamente antes de la medida de la actividad. Las condiciones de experimentación y los resultados obtenidos aparecen en la fig. 21. En ella puede observarse, que el máximo de la actividad oxidásica, se encuentra alrededor de 8,4 unidades de pH.

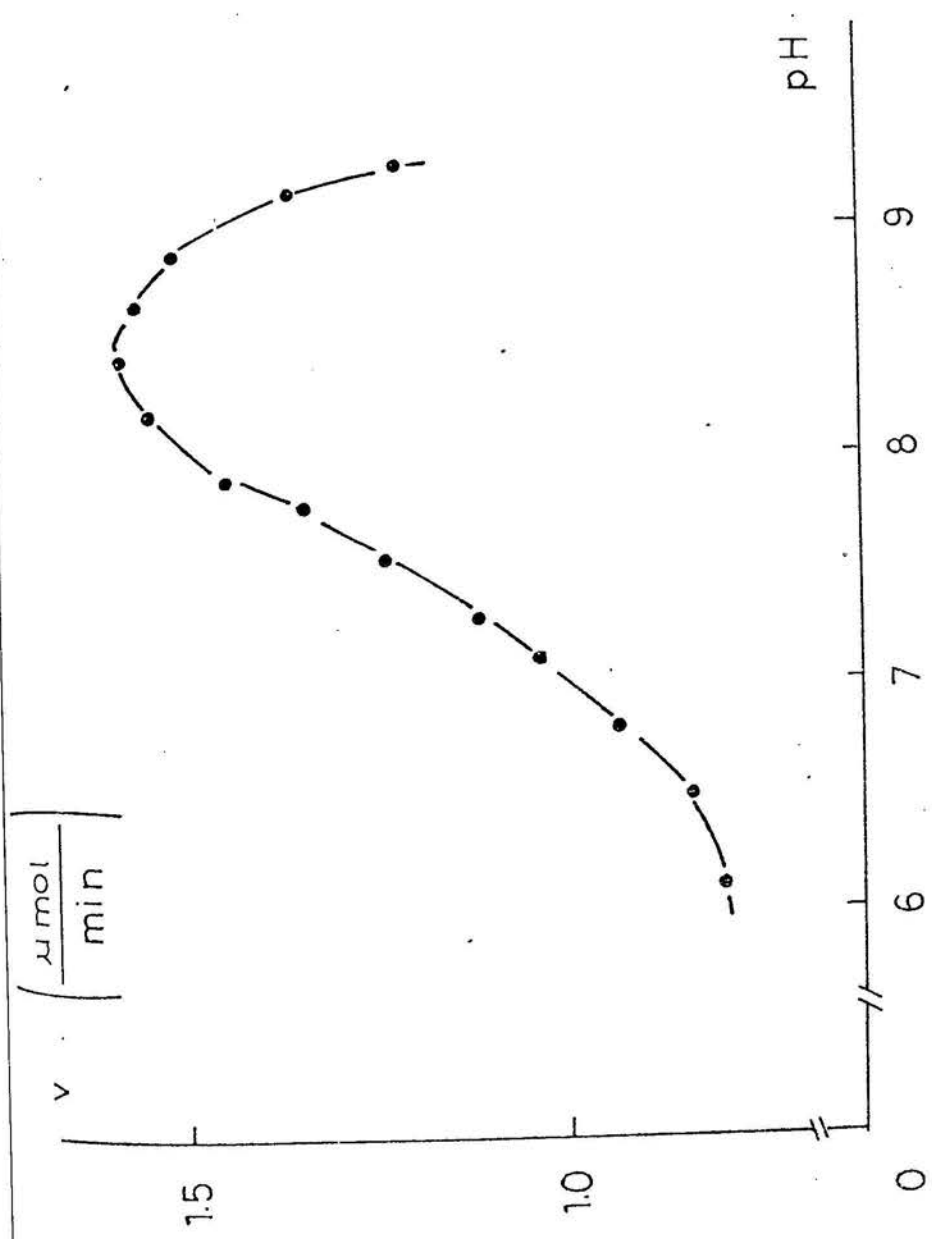


Fig. 21 pH óptimo del Sa XANTINA-O₂-XO-AC.URICO-H₂O₂
 Tampón tris-fosfato sódico 50 mM ; [XO] = 0,4 U/ml ; [xantina] = 5x10⁻⁵ M

4.5.2 DETERMINACION DE LA K_M APARENTE DEL SISTEMA
XANTINA- O_2 -XO-AC.URICO- H_2O_2

Una vez establecido el pH óptimo de actuación del enzima, se procedió a determinar los parámetros cinéticos de éste con respecto a la xantina.

Las determinaciones de actividad, se efectuaron a pH 8 en lugar de a 8,4 - dado que este pH no se puede alcanzar mediante la utilización del tampón de fosfato sódico - a fin de evitar la introducción de moléculas extrañas a los sistemas fisiológicos (tampón tris-fosfato sódico).

Los resultados obtenidos aparecen en la fig. 22, los cuales conducen tanto en la representación de Lineweaver-Burck como en la de Eadie-Hofstee a representaciones no lineales, con las que no es posible efectuar el análisis clásico del sistema.

La aparición de desviaciones de la linealidad indujo a efectua la representación de Hill para estos resultados, la cual es aplicable a sistemas alóstericos, pero puede utilizarse también en sistemas con representaciones no lineales. Para efectuarla se escogió el valor de $V_{máx}$, extrapolado de la representación de Lineweaver-Burck y de Eadie-Hofstee ($V_{máx} = 11,36$ mol ac. úrico/min.) (fig. 22 a y 22 b). Se aprecia en la fig. 23 que la representación de Hill conduce a una recta de pendiente 0,45 , lo cual indica que existe una cooperatividad negativa.

El hecho de que el valor de la pendiente sea de 0,45 , no indica que éste sea necesariamente el menor valor posible, sino el que corresponde en las condiciones de experimentación, y es indicio claro de que la molécula de XO se comporta cinéticamente de modo distintos al que podría esperarse de una enzima michaeliano que poseyese un solo centro.

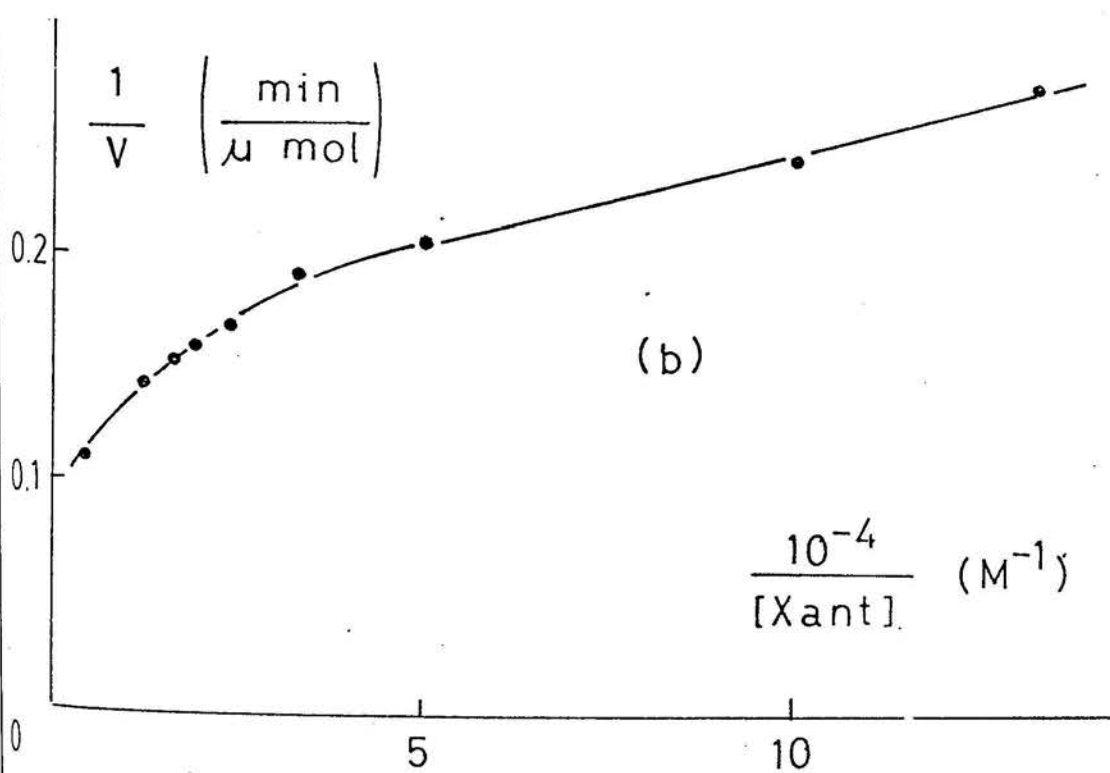
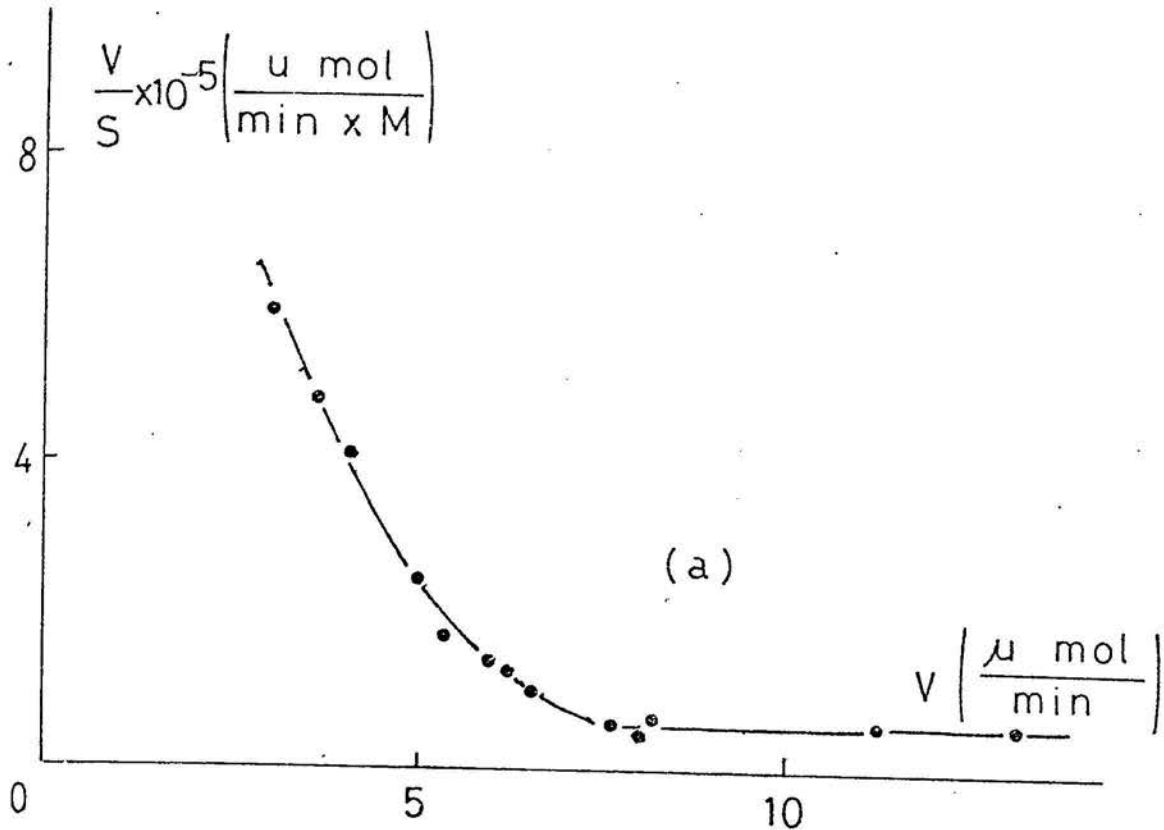


Fig. 22 Cálculo parámetros aparentes (S^a XANTINA-O₂-XO-AC.URICO-H₂O₂)
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0 ; [XO] = 0,4 U/ml
 (a) Representación de Eadie-Hofstee
 (b) Representación de Lineweaver-Burck

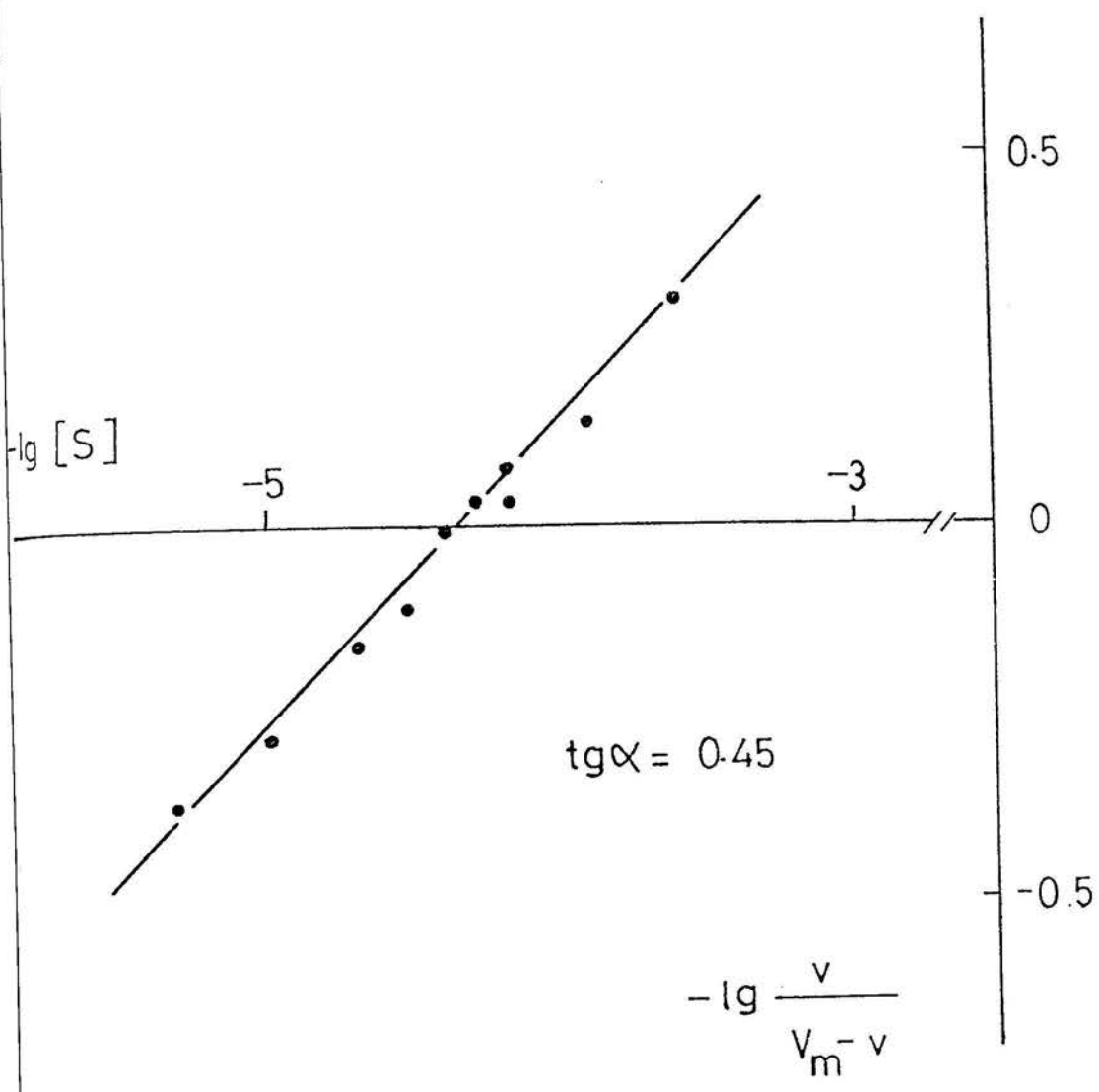


Fig. 23 Representación de Hill correspondiente a la fig.22

Dado que las representaciones de Lineweaver-Burck y de Eadie-Hofstee son no lineales y que la de Hill proporciona un valor de pendiente prácticamente 1/2 (0,45), se procedió a efectuar la representación de 1/v frente a $1/[xantina]^{1/2}$, ya que el caso más sencillo de cooperatividad negativa (para pendiente = 1/2) daría lugar a la aparición de linealidad en esta representación.

Puede observarse en la fig. 24, que los resultados se muestran lineales, lo que implica que en el margen de concentración investigado, la ecuación de velocidad se adapta a la forma:

$$v = \frac{V_{\text{máx}} S^{1/2}}{K + S^{1/2}}$$

A continuación se procedió a determinar si tenía lugar el fenómeno de inhibición de la actividad oxidásica de la XO por exceso de sustrato; no se presenta inhibición ni aún en presencia de concentraciones de xantina de hasta 1×10^{-3} M.

4.5.3 INHIBICIÓN POR AC. URICO DE LA ACTIVIDAD DE LA XO (CON RESPECTO A LA XANTINA)

El efecto que la presencia del producto de la reacción, el ácido úrico, ejerce sobre la actividad de la XO, se ha determinado frente a la xantina considerada como sustrato variable.

Como puede observarse en la fig. 25, los resultados de esta experiencia conducen a una representación en la que no puede apreciarse el carácter de la inhibición, y que la representación de las inversas de velocidad frente a las inversas del sustrato no es lineal, tal como ya ocurría en ausencia del producto inhibidor.

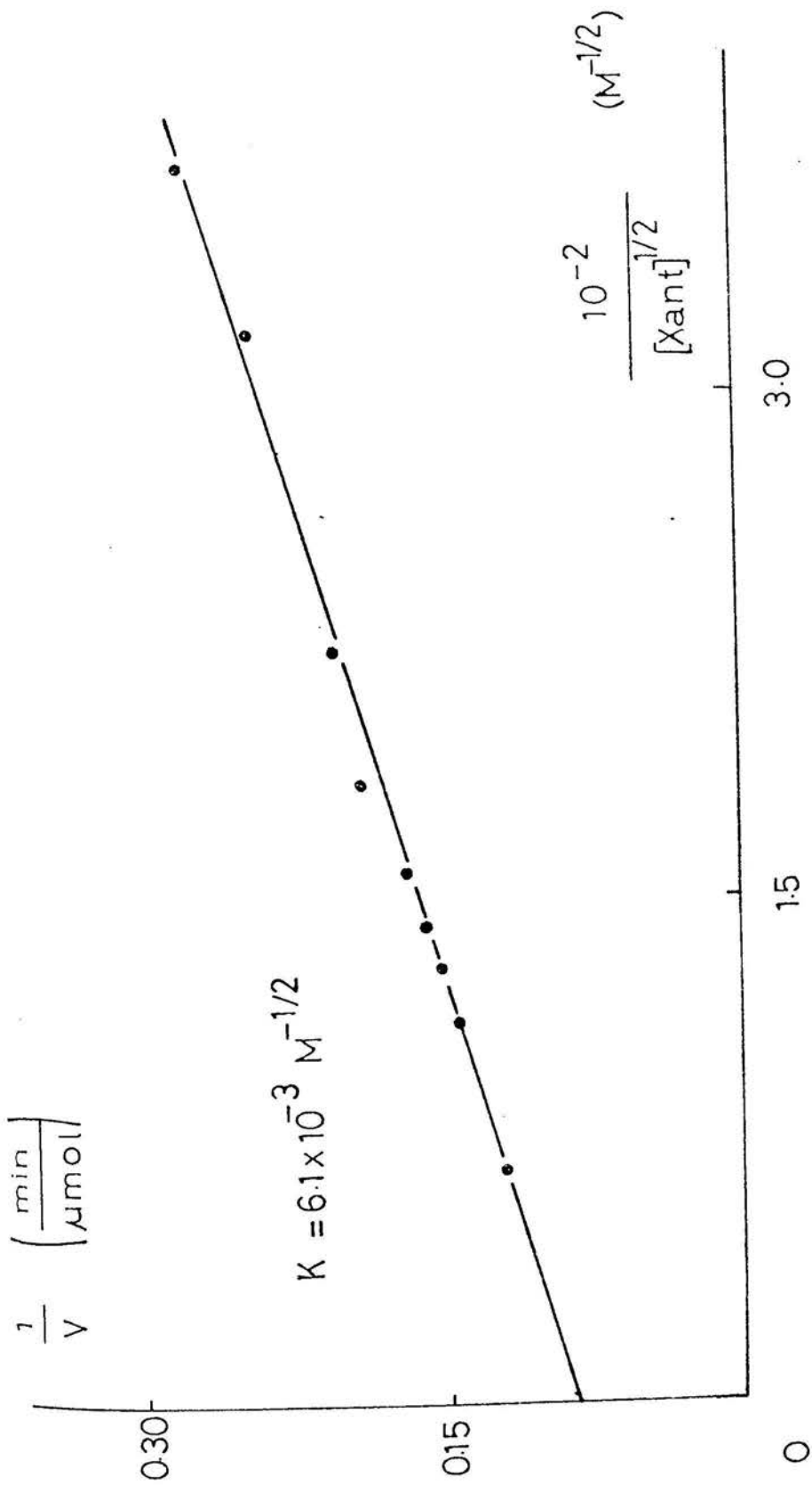


Fig. 24 Representación de $1/v$ frente a $1/[xantina]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 22

Para solventar dicha dificultad, se procedió de la misma forma que en el apartado anterior ; se han representado los valores de $1/v$ frente a $1/[xantina]^{1/2}$, para averiguar si cuando existe ácido úrico en el medio, se presenta igualmente la linealidad. En la fig. 26 a, se pone de manifiesto que la hipótesis es correcta, observándose, asimismo, que la inhibición es de tipo no competitivo. Por otra parte, la representación secundaria de las inversas de velocidad frente a la concentración de ácido úrico no es lineal.

Para conocer de que forma interaccionar el ácido úrico con el enzima, se efectuó la representación de $1/v$ frente a $[\text{ac. úrico}]^{1/2}$, ajustándose en este caso a la linealidad.

La representación secundaria de las intersecciones frente a $[\text{ac. úrico}]^{1/2}$, dió lugar a una línea recta (fig. 27 a) y en la de las pendientes esto ocurre cuando se representan frente a la concentración de ácido úrico (fig. 27b).

4.5.4 INHIBICION POR NADH DE LA ACTIVIDAD DE LA XO (CON RESPECTO A LA XANTINA)

El establecimiento del mecanismo cinético del enzima precisa determinar el tipo de inhibición que ejerce el NADH, sobre la actividad oxidásica considerando a la xantina como sustrato variable.

Puede observarse en la fig. 28 a, que al igual que ocurría cuando el inhibidor era el ácido úrico, la inhibición con respecto a la xantina es no lineal, lo cual está justificado por el carácter no lineal que tiene la representación de $1/v$ frente a $1/[xantina]$. Asimismo, se pone de manifiesto que la representación secundaria de Dixon de $1/v$ frente a la concentración de NADH, posee un carácter hiperbólico (fig. 28 b).

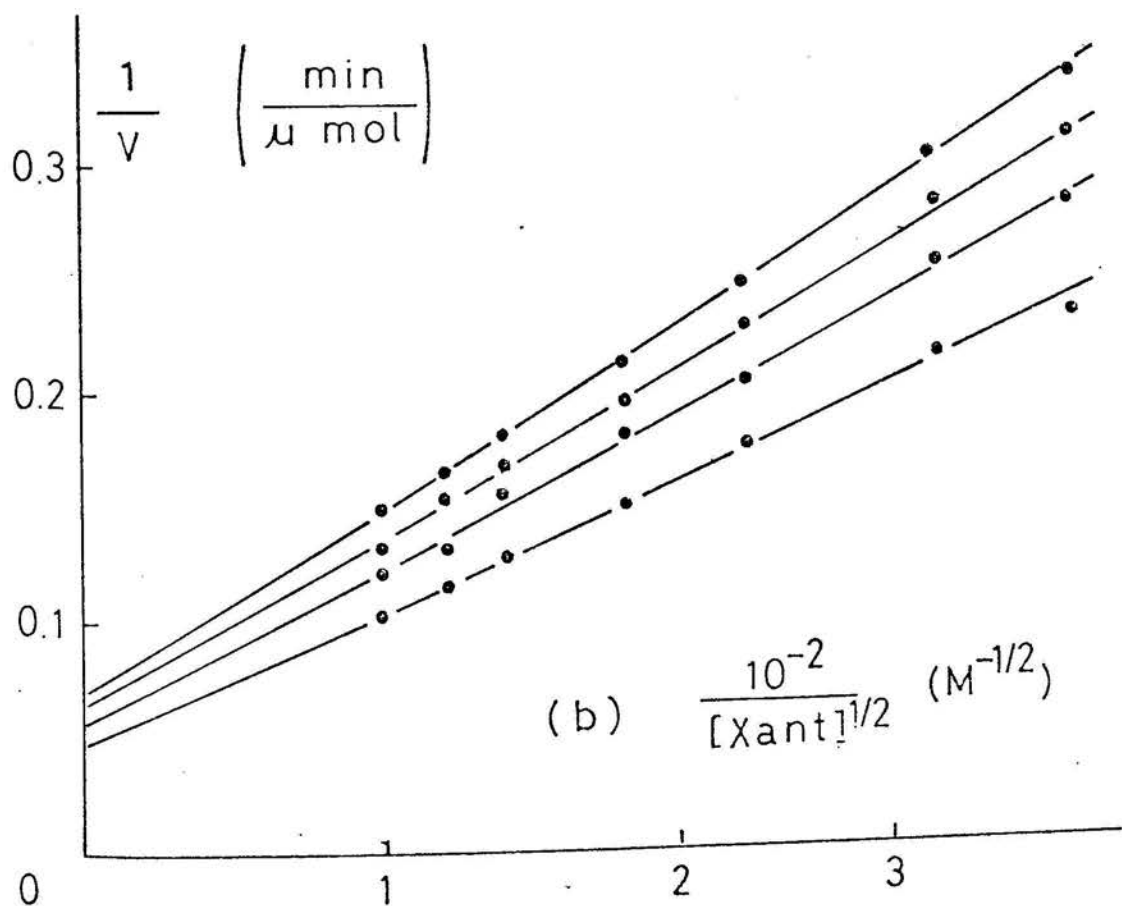
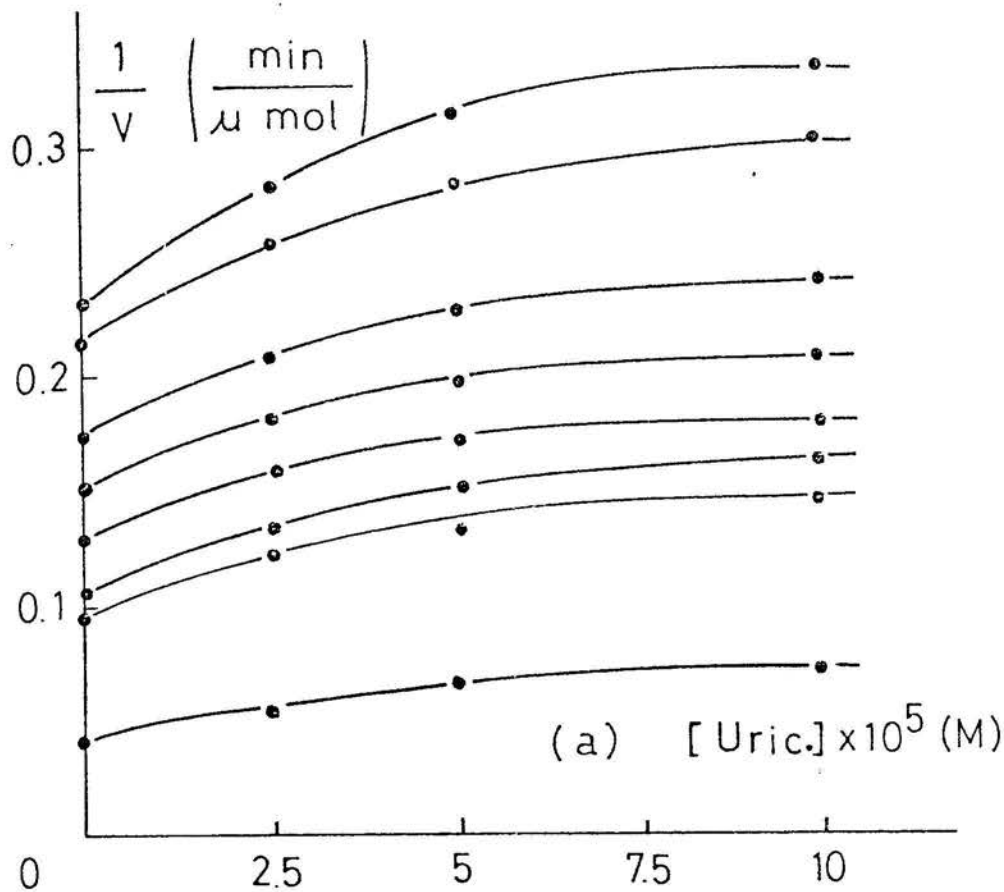


Fig. 26 (a) Representación de Dixon correspondiente a la fig. 25

(b) Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{xantina}]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 25

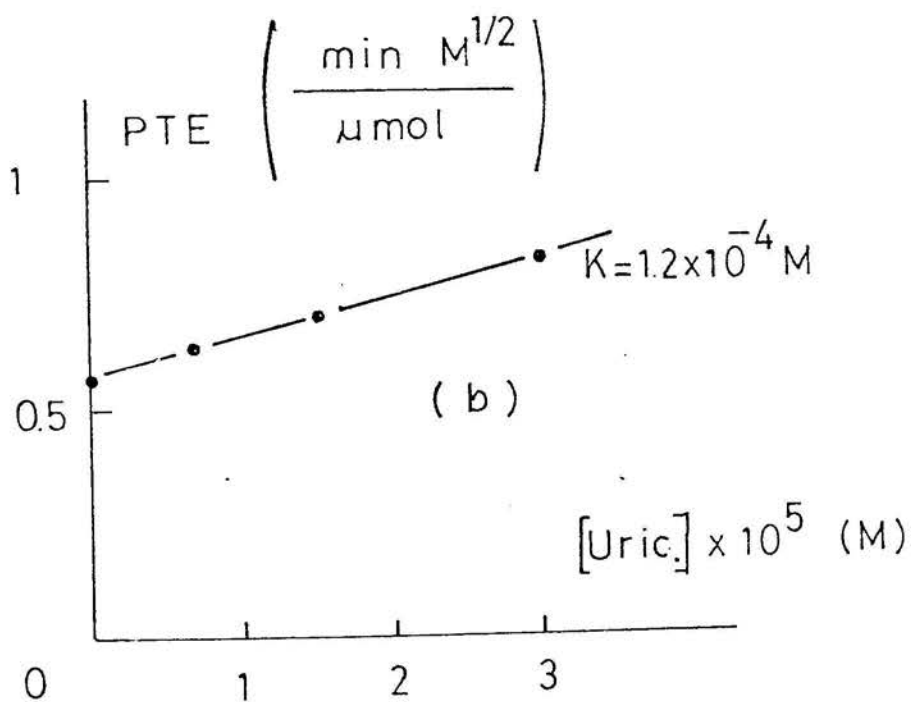
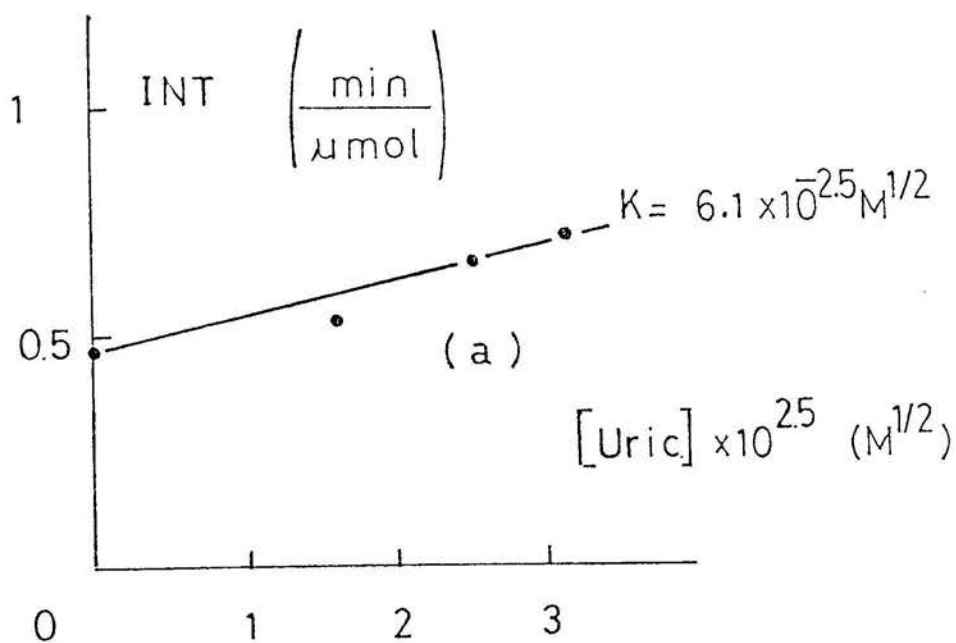


Fig. 27 (a) Representación secundaria de intersecciones frente a $[\text{ác.úrico}]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 26 b
 (b) Representación secundaria de pendientes frente a $[\text{ác.úrico}]$ correspondiente a la fig. 26 b

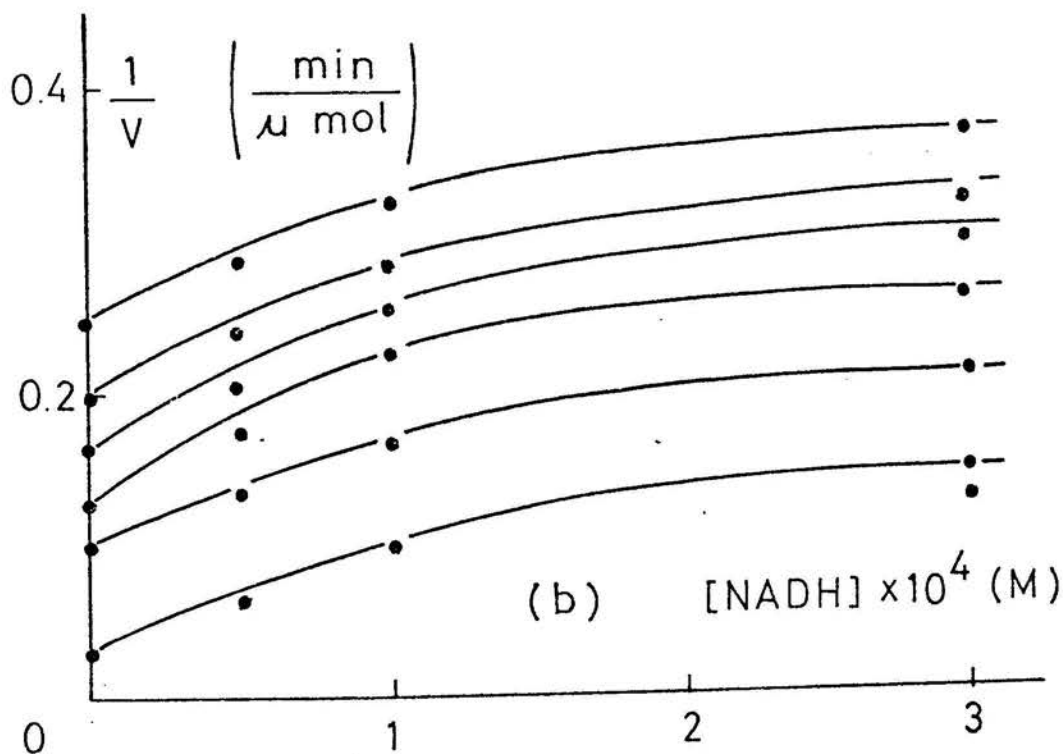
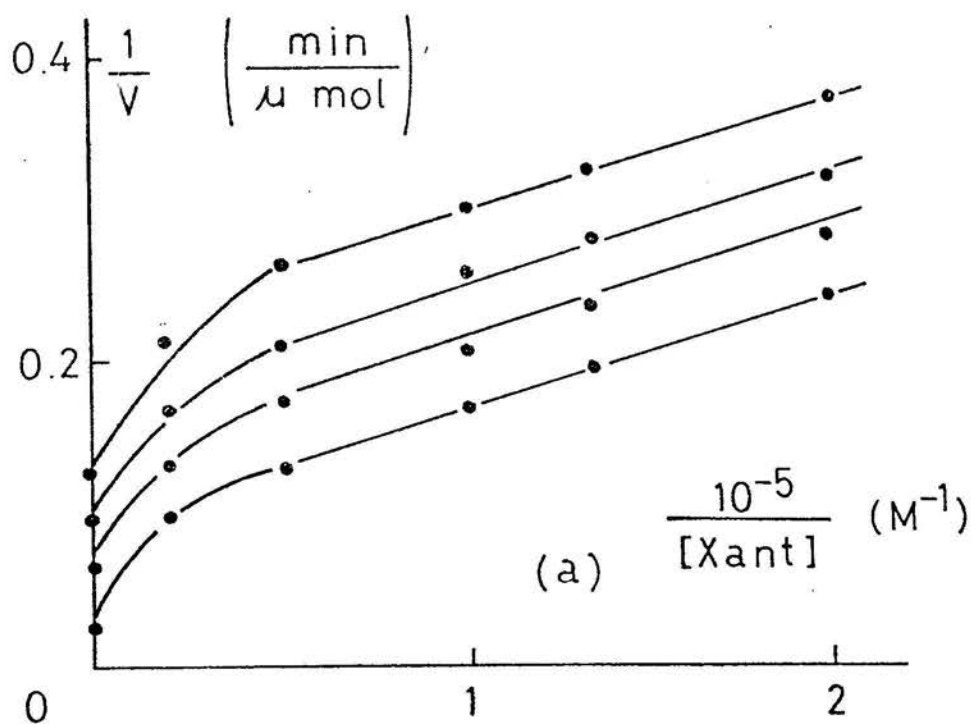


Fig. 28 Inhibición de la XO por NADH (S^a XANTINA-O₂-XO-AC.URICO-H₂O₂) ; Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0 ; $[XO] = 0,4U/ml$
De abajo a arriba: $[NADH] \times 10^5 M^{-1} = 0; 5; 10; 30$

(a) Representación de Lineweaver-Burck

(b) Representación secundaria de Dixon correspondiente a la fig. 28 a

Análogamente a como se efectuó en el apartado anterior, se representaron las inversas de velocidad frente a $1/[\text{xantina}]^{1/2}$ y se obtuvo una representación lineal tal como era de esperar (fig. 29 a); este resultado permite caracterizar la inhibición como acompetitiva. Sin embargo, cuando se representa $1/v$ frente a $[\text{NADH}]^{1/2}$ los resultados fueron no lineales (fig. 29 b), aparecen curvas de tipo parabólico (en la representación de Dixon eran de tipo hiperbólico). Este cambio de sentido ocurre igual cuando se representan las intersecciones frente a $[\text{NADH}]$ ó $[\text{NADH}]^{1/2}$ (fig. 29 c).

4.5.5. DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE ACTUACION DE LA XO CON LA HIPOXANTINA COMO SUSTRATO

Una vez establecido el comportamiento cinético de la XO, cuando cataliza la oxidación de la xantina, se procedió al estudio de la forma de actuación del enzima cuando el sustrato sobre el que actúa es la hipoxantina.

En primer lugar, se procedió a determinar el pH óptimo de actuación cuando el enzima cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina, utilizando el oxígeno como aceptor electrónico.

Como puede observarse en la fig. 30 los resultados son análogos a los obtenidos cuando el sustrato considerado era la xantina hallándose el máximo de actividad alrededor de 8,4 unidades de pH, lo que es un primer indicio de la analogía del comportamiento del enzima frente a ambos sustratos.

4.5.6 DETERMINACION DE LA K_M APARENTE DEL SISTEMA HIPOXANTINA-O₂-XO-XANTINA-H₂O₂

Al igual que cuando el sustrato utilizado era la xantina, se escogió como pH de trabajo el de 8,0, justificándose este hecho por los motivos reseñados en 4.5.2.

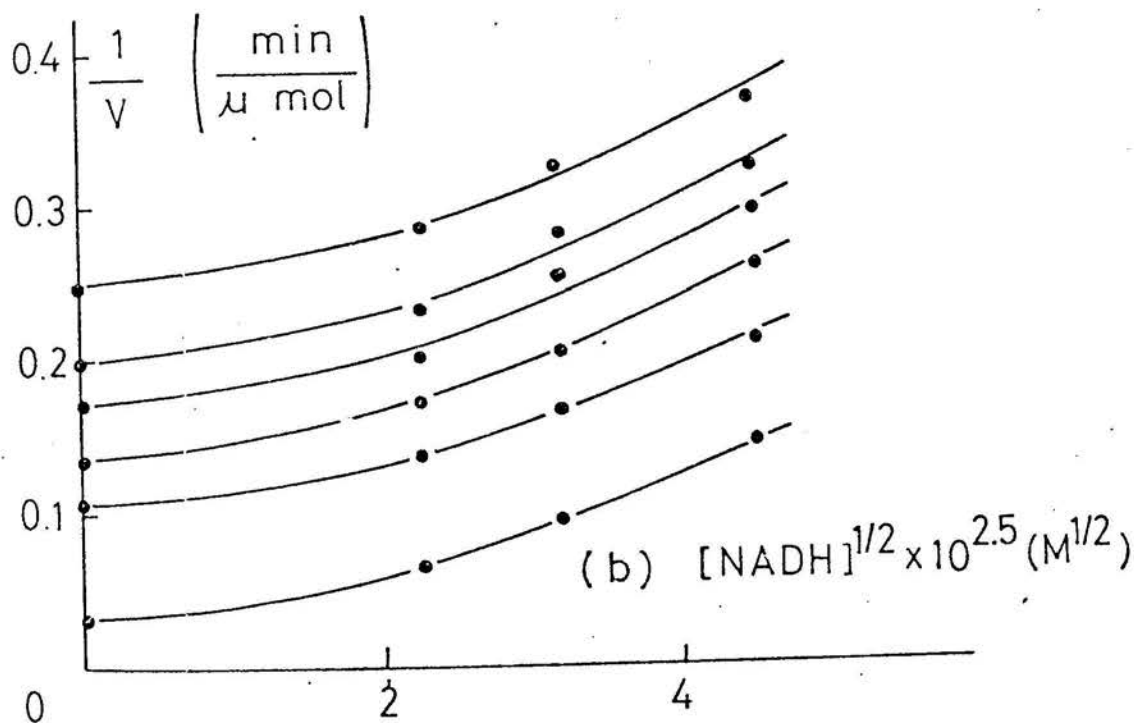
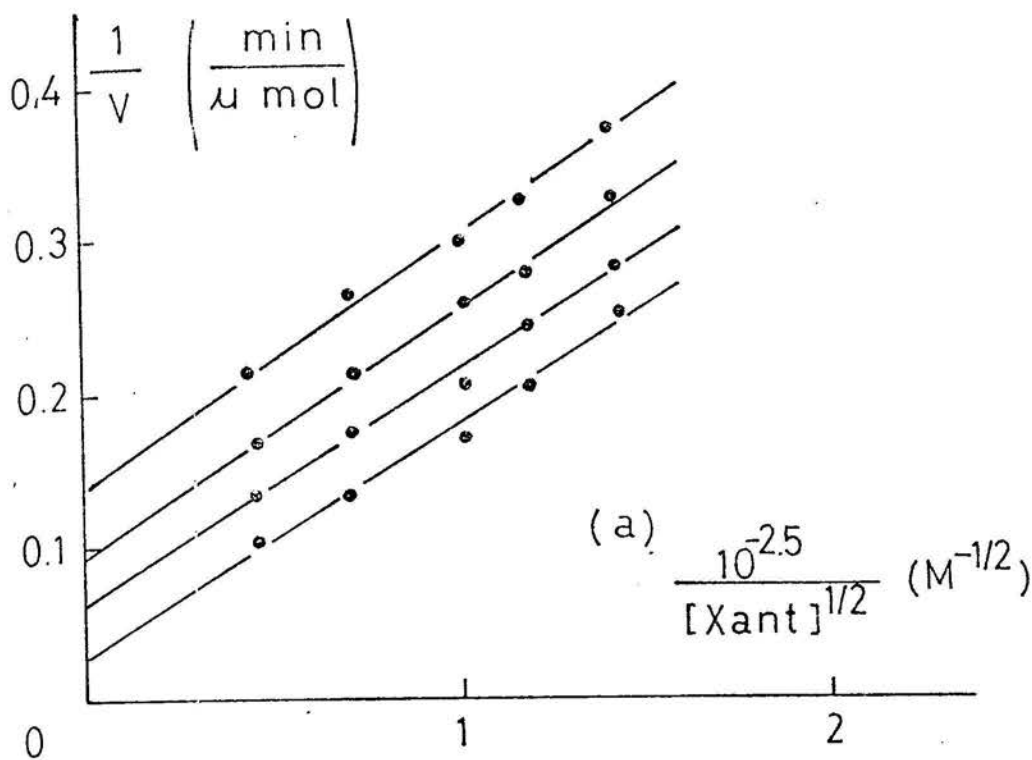


Fig. 29 (a) Representación de $1/v$ frente a $1/[xantina]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 28 a
 (b) Representación de $1/v$ frente a $[NADH]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 28 a

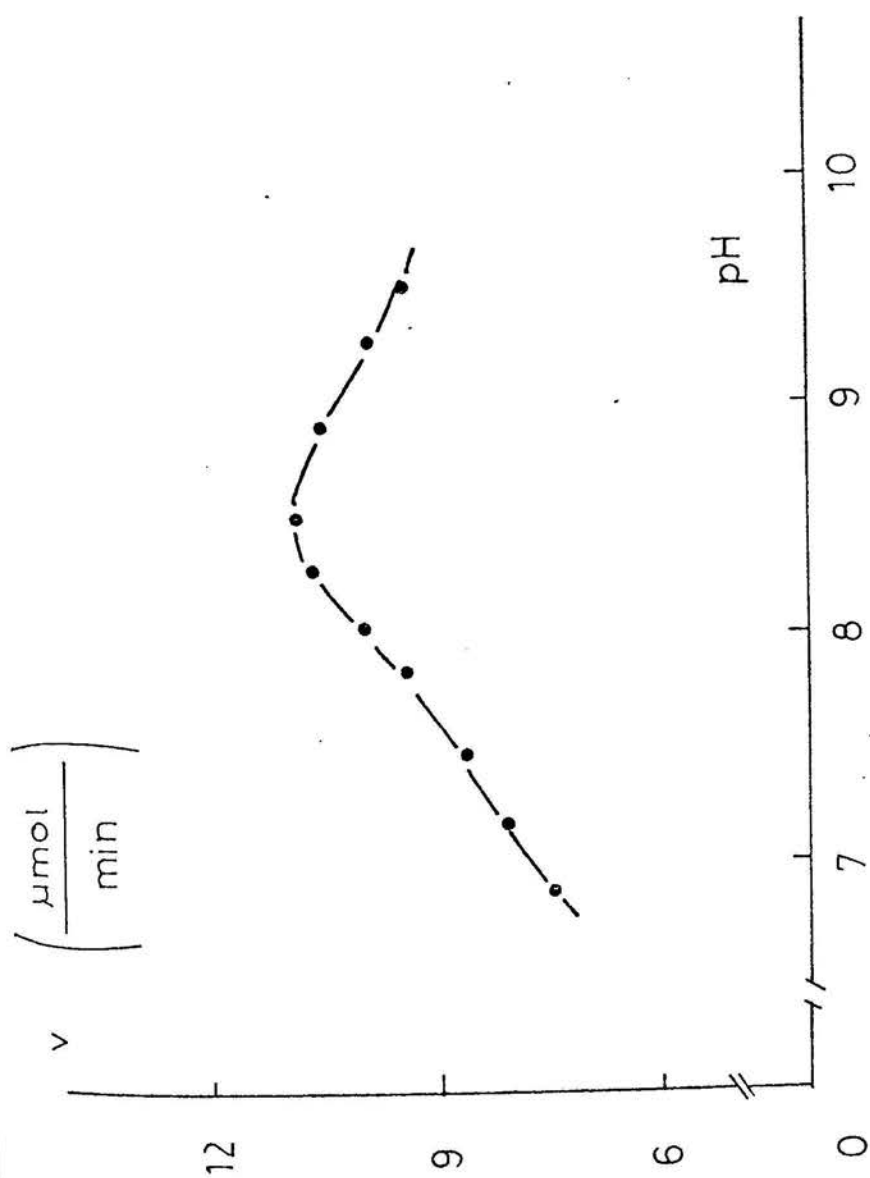


Fig. 30 pH óptimo del Sa. HIPOXANTINA-O₂-XANTINA-IL₂O₂
 Tampón tris-fosfato sódico 50 mM ; [XO] = 0,4 U/ml ; [hipoxantina] = 4x10⁻⁵ M