



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

Los resultados obtenidos aparecen en la fig. 31 a, en la que puede observarse que la representación de Lineweaver-Burck no es lineal, si bien la desviación que aparece es muy pequeña. Se pone de manifiesto este fenómeno, al representar $1/v$ frente a $1/[\text{hipoxantina}]^{1/2}$ (fig. 31 b), donde se observa que los valores experimentales de las inversas de velocidad se adaptan con mayor exactitud a la recta así obtenida. Este hecho está de acuerdo con los resultados obtenidos utilizando la xantina como sustrato variable.

Una diferencia importante con respecto a la xantina es la aparición del fenómeno de inhibición por exceso de hipoxantina, que se observa cuando las concentraciones de ésta son superiores a 4×10^{-5} M.

De forma análoga se efectuó la representación de Hill a partir de los datos de la fig. 31 b, la cual dió lugar a la obtención de una recta de pendiente 0,5 (fig. 32).

4.5.7 INHIBICION POR EXCESO DE HIPOXANTINA DE LA XO

El que el exceso de hipoxantina provoque inhibición cuando su concentración es superior a 4×10^{-5} M, permite efectuar un tratamiento cinético de dicho fenómeno, para poder establecer de que forma interacciona la molécula del sustrato con la de XO cuando aquél se encuentra en concentración superior a la saturante.

Al efectuar la representación de Haldane y Murray, $1/v$ frente a $[\text{Hipoxantina}]$, para concentraciones de sustrato superiores a la saturante, se puede observar, tomando el valor de la intersección correspondiente a la fig. 31 b como la intersección de la representación de Haldane y Murray, que los valores de $1/v$ se desvían de la linealidad (fig. 33 a) é sin embargo, al efectuar la representación de $1/v$ frente a $[\text{hipoxantina}]^{1/2}$, se observó una recta como se pone de manifiesto en la fig. 33 b.

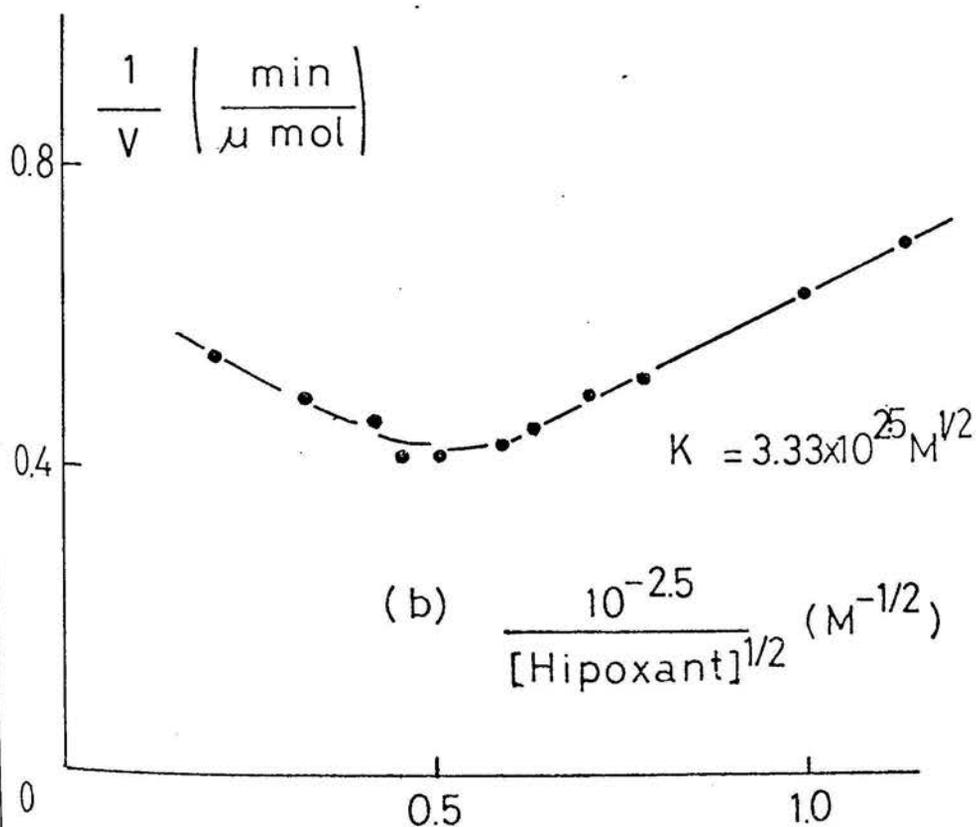
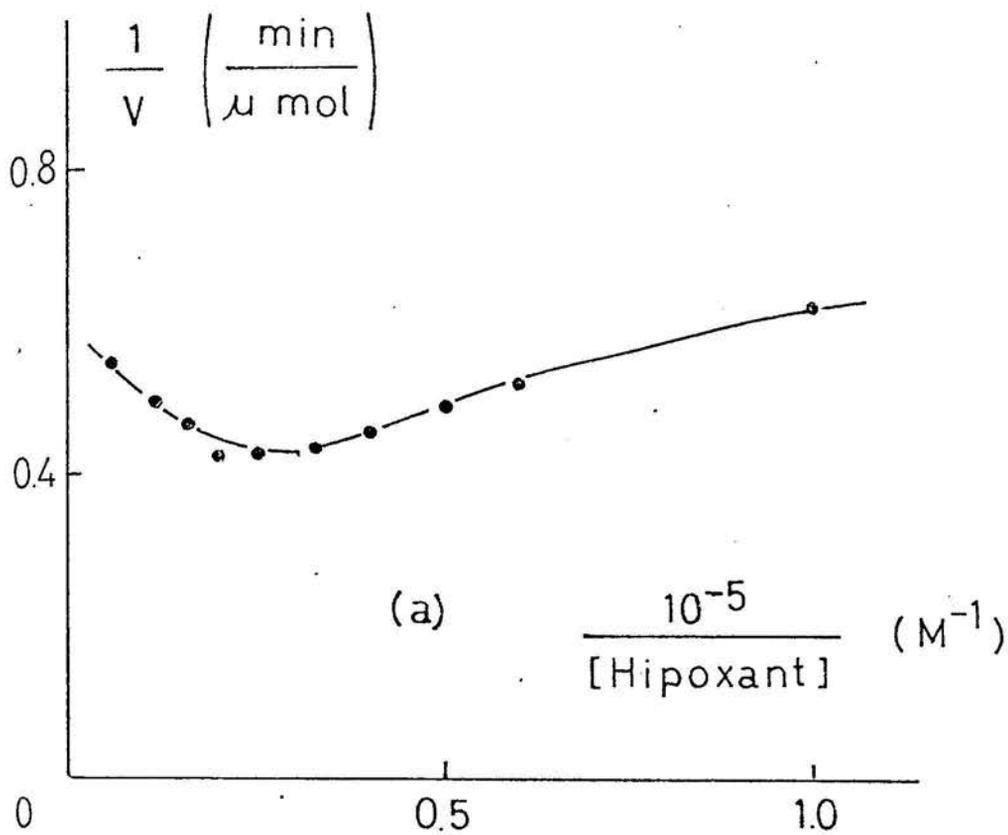


Fig. 31 Cálculo de los parámetros aparentes (SA HIPOXANTINA- O_2^- -XO-XANTINA- H_2O_2) ; Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0
 $[\text{XO}] = 0,4 \text{ U/ml}$

(a) Representación de Lineweaver-Burck

(b) Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{hipoxantina}]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 31 a

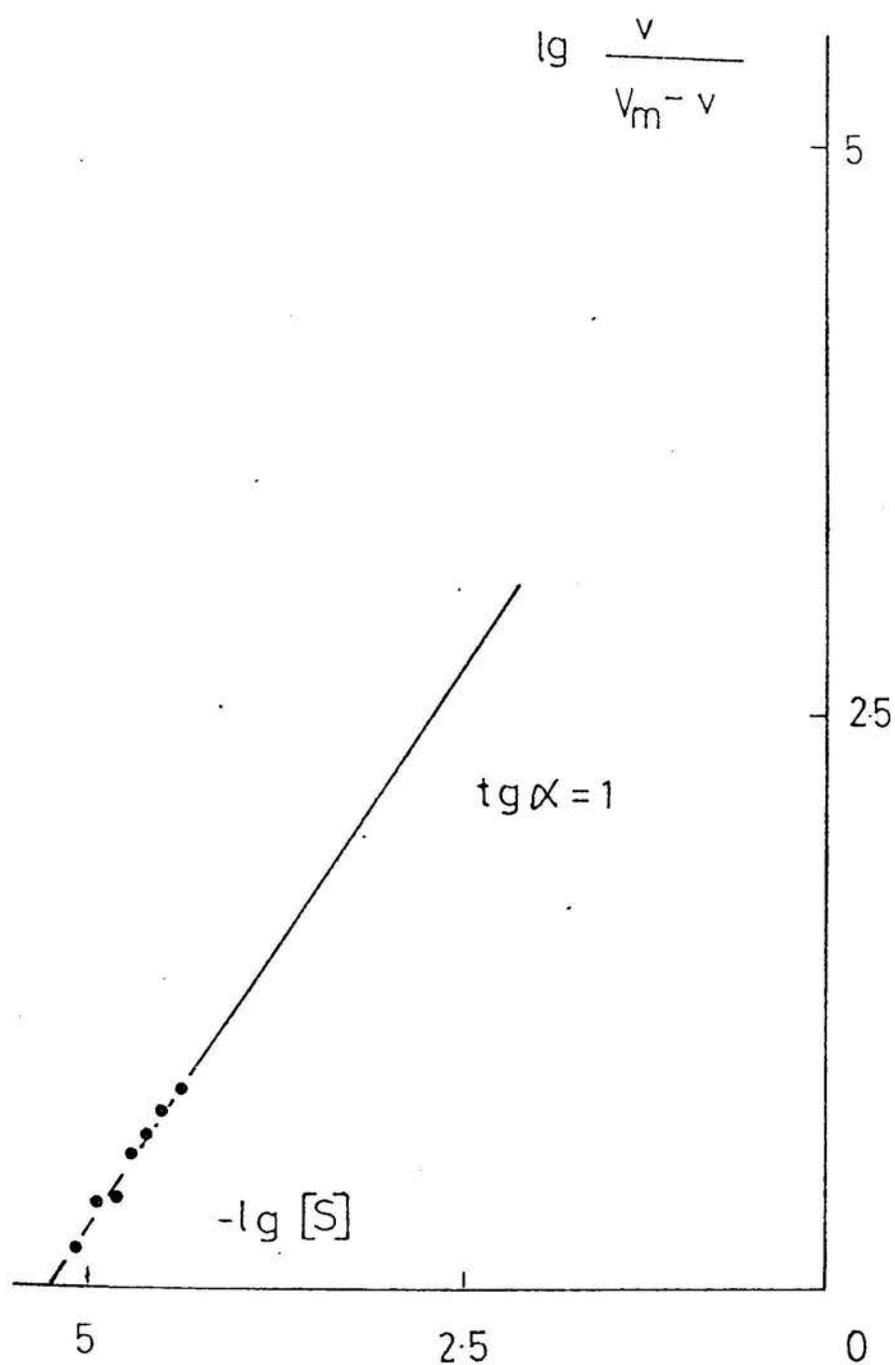


Fig. 32 Representación de Hill correspondiente a la fig. 31 a

4.5.8 INHIBICION POR ACIDO URICO DE LA XO (CON RESPECTO A LA HIPOXANTINA)

En el estudio comparativo del comportamiento de la XO cuando los sustratos son la hipoxantina y la xantina, se procedió a establecer el efecto que provoca el ácido úrico, producto final de la secuencia metabólica de oxidación de la hipoxantina catalizada por la XO.

En la fig. 34 a, se puede apreciar que la inhibición provocada por el ácido úrico, es de carácter no lineal, por lo que, análogamente a experiencias anteriores se efectuó la representación de $1/v$ frente a $1/[hipoxantina]^{1/2}$. Se obtiene así una representación lineal, la cual permite observar el carácter no competitivo mezclado de la inhibición (fig. 34 b).

La representación secundaria de las intersecciones y de las pendientes correspondientes a la fig. 34 b, frente a $[\text{ác.úrico}]$ conduce a la obtención de representaciones parabólicas (fig. 35 a) e hiperbólicas (fig. 35 b), respectivamente. Al representar las intersecciones frente a $[\text{ác.úrico}]^2$ tampoco se obtiene linealidad (fig. 35 c); sin embargo, al representar las pendientes frente a $[\text{ác.úrico}]^{1/2}$ se obtiene una recta (fig. 35 d). La correspondiente representación de Dixon no proporciona líneas rectas frente a $[\text{ác.úrico}]$, ni frente a $[\text{ác.úrico}]^2$.

4.5.9 DETERMINACION DE LA K_M APARENTE DEL SISTEMA NADH-O₂-XO-NAD⁺-H₂O₂

Se ha considerado el estudio de la reacción de oxidación del NADH a NAD⁺, catalizada por la XO utilizando el oxígeno como aceptor electrónico, reacción que se denomina diaforásica.

No resulta posible, el establecer el pH óptimo con exactitud, ya que a pH bajo se descompone el NADH rápidamente, y por otra

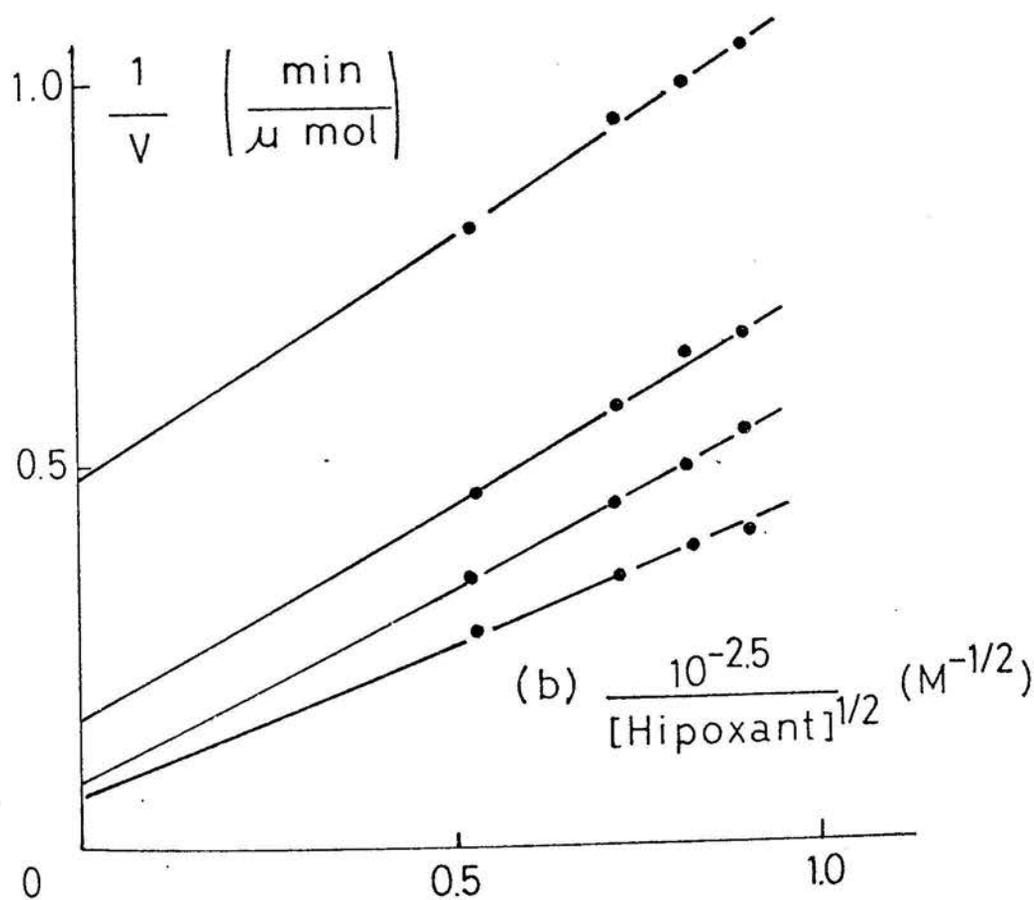
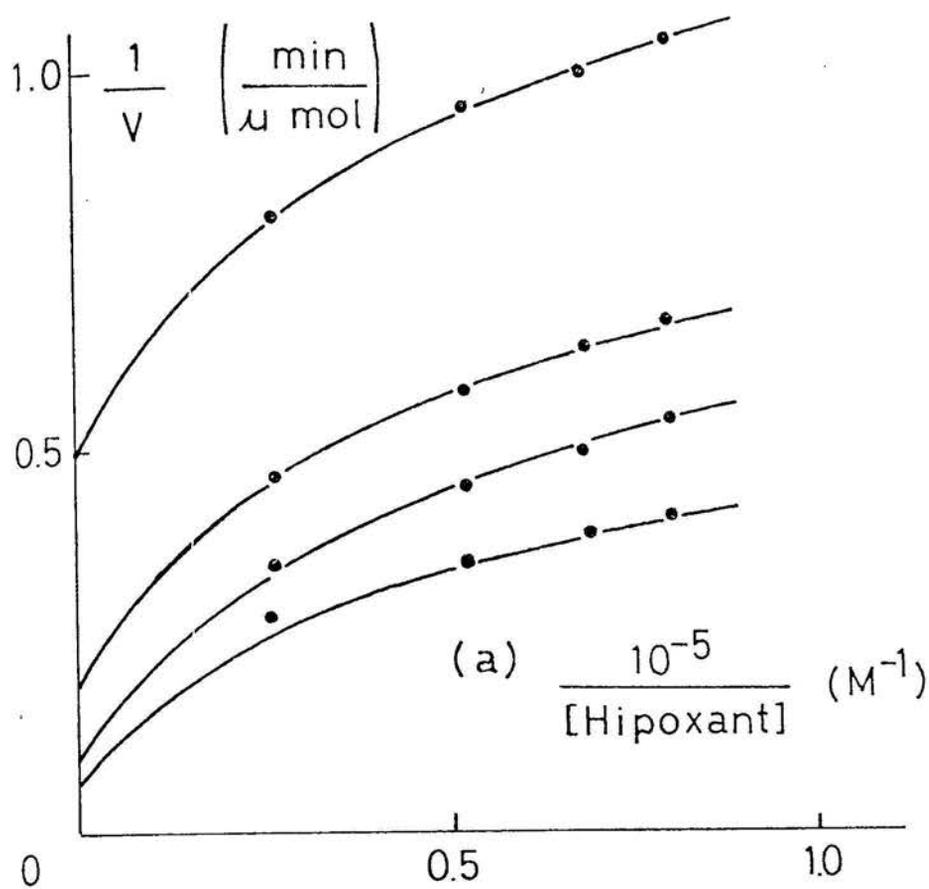


Fig. 34 Inhibición de la XO por ácido úrico (Se HIPOXANTINA- O_2 -XO-XANTINA- H_2O_2) ; Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0. $[\text{XO}] = 0,4 \text{ U/ml}$. De abajo a arriba: $[\text{ácúrico}] \times 10^5 \text{ M}^{-1} = 0; 2; 4; 6$

(a) Representación de Lineweaver-Burck

(b) Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{hipoxantina}]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 34 a

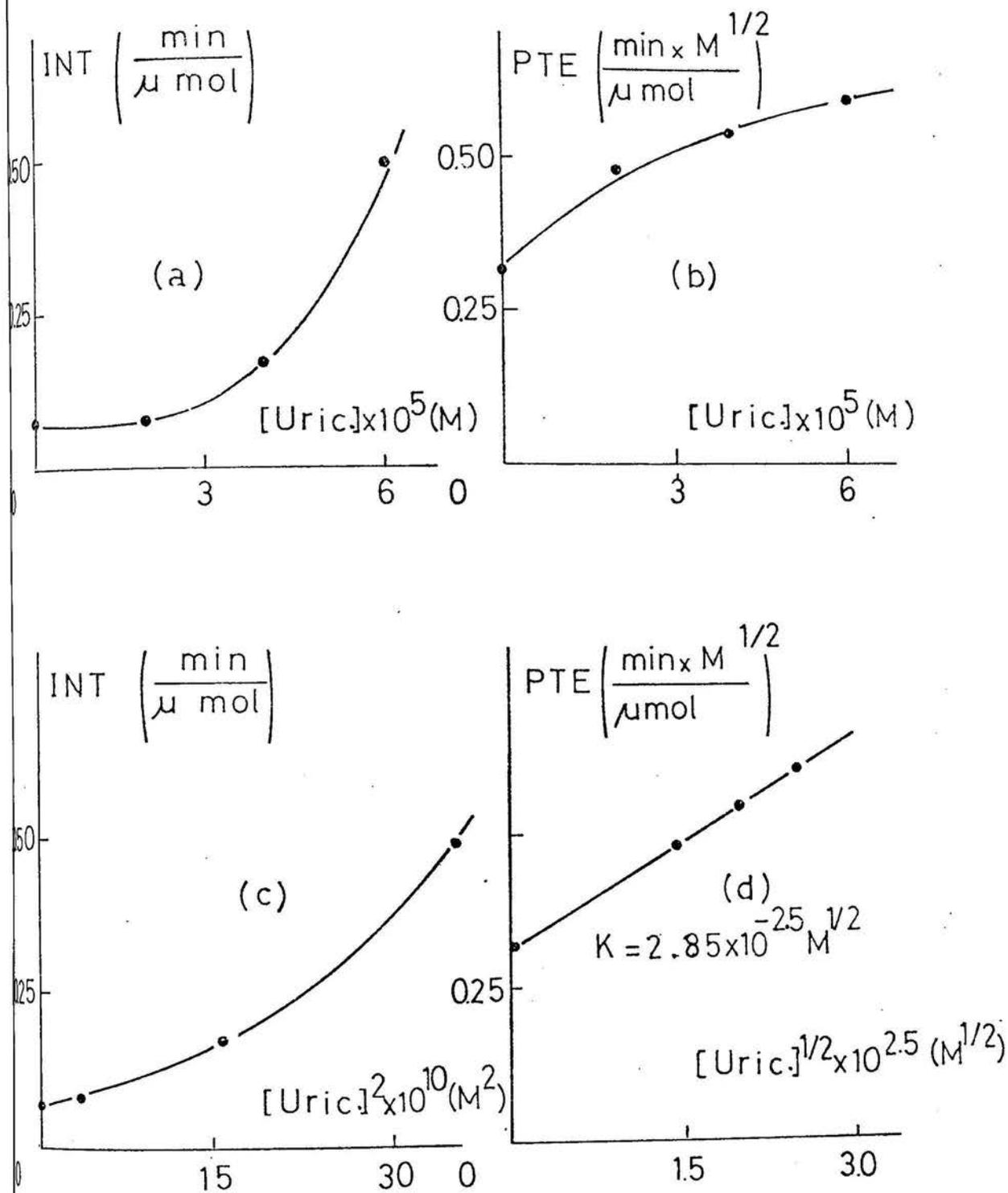


Fig. 35 (a) Representación secundaria de intersecciones frente a $[ác. úrico]$ correspondiente a la fig. 34 b
 (b) Representación secundaria de pendientes frente a $[ác. úrico]$ correspondiente a la fig. 34 b
 (c) Representación secundarua de intersecciones frente a $[ác. úrico]^2$ correspondiente a la fig. 34 b
 (d) Representación secundaria de pendientes frente a $[ác. úrico]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 34 b

parte, al trabajar con tampones a pH inferior a 5, sus iones provocan alteraciones de la enzima.

Se trabajó a pH 6, al cual el enzima no se altera y su actividad es mayor que a pH más alcalino.

Los resultados obtenidos al determinar el valor de K_M , mediante la representación de Lineweaver-Burck aparecen en la fig. 36 a ; se observa que no es lineal de forma análoga a lo que ocurre cuando el sustrato era la xantina ó la hipoxantina.

Al representar $1/v$ frente a $1/[NADH]^{1/2}$, aparecen rectas (fig. 36 b).

Asimismo, la representación de Hill conduce a una recta de pendiente 0,5 (fig. 37), tal como ocurre cuando los sustratos son la xantina o la hipoxantina.

4.5.10 INHIBICION POR NAD^+ DE LA XO (RESPECTO AL NADH)

El análisis del efecto que ejercen las concentraciones del producto NAD^+ , sobre la actividad de la XO en la reacción diaforásica aparece en la fig. 38 a. En ella puede observarse, que la inhibición tiende a ser competitiva, sin que pueda precisarse con exactitud dado el carácter no lineal de la representación de Lineweaver-Burck. Mediante la representación de $1/v$ frente a $1/[NADH]^{1/2}$, se obtienen rectas, lo que permite definir el carácter competitivo de la inhibición (fig. 38 b).

La representación secundaria de las pendientes frente a $[NAD^+]$ no es lineal (fig. 39 a) ; sin embargo, cuando se efectúa frente a $[NAD^+]^{1/2}$ ésta se transforma en lineal (fig. 39 b).

Análogamente, la representación de Dixon no es lineal (fig. 40 a) y su correspondiente de $1/v$ frente a $[NAD^+]$ da lugar a líneas rectas (fig. 40 b).

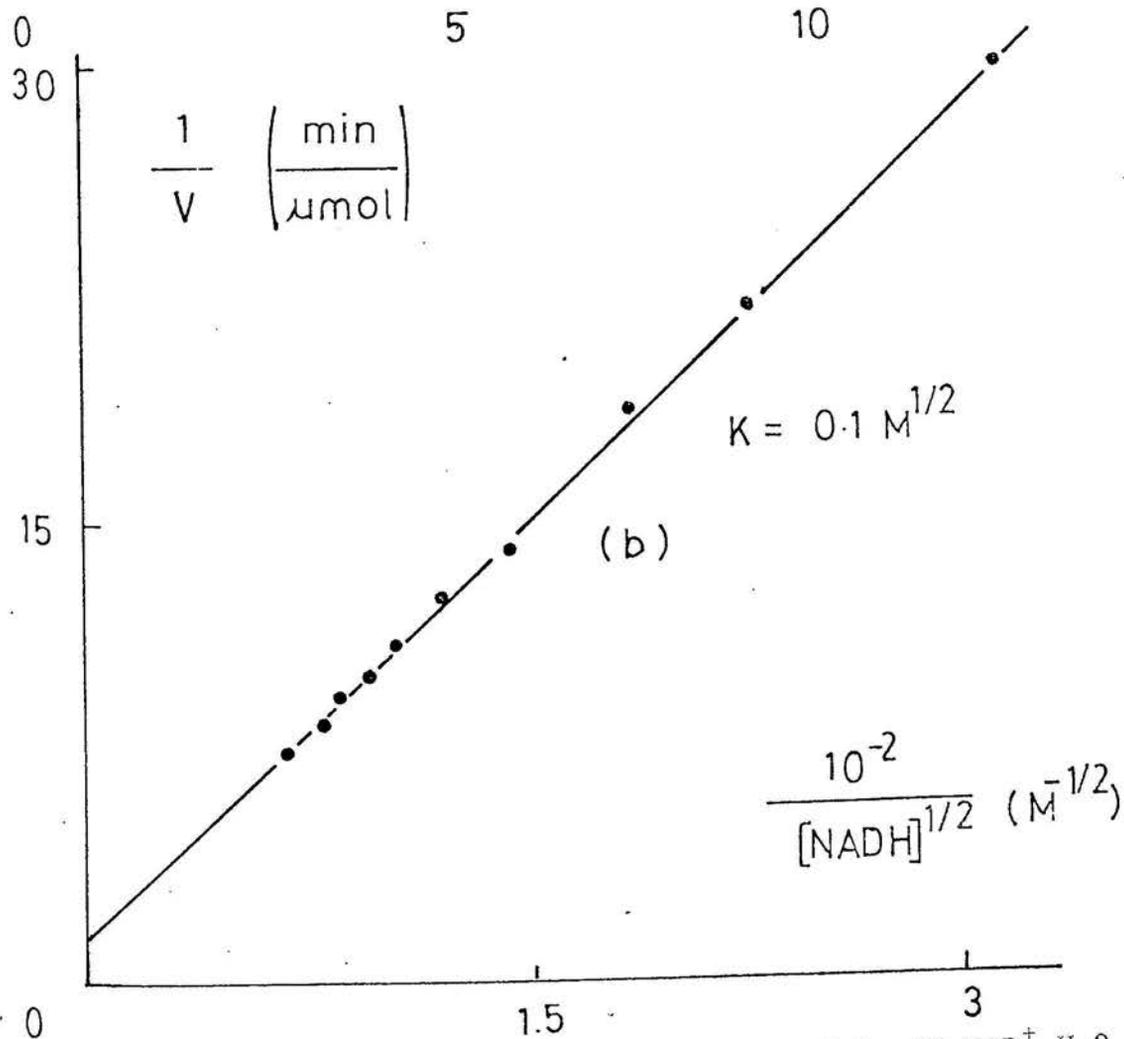
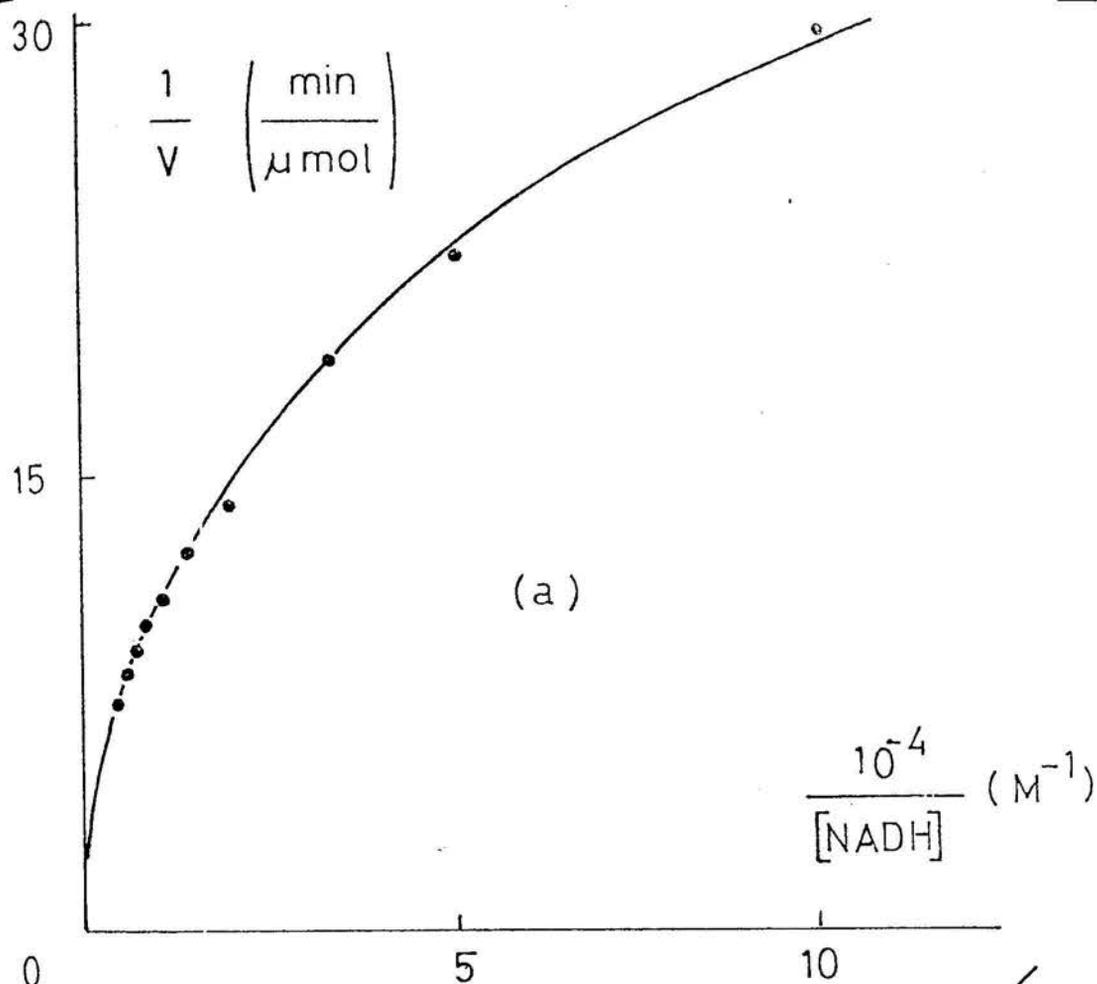


Fig. 36 Cálculo parámetros aparentes ($S \rightleftharpoons \text{NADH-O}_2\text{-XO-NAD}^+ \text{-H}_2\text{O}_2$)
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0 ; $[\text{XO}] = 0,4 \text{ U/ml}$
 (a) Representación de Lineweaver-Burck
 (b) Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NADH}]^{1/2}$ correspondiente a la fig 36 a

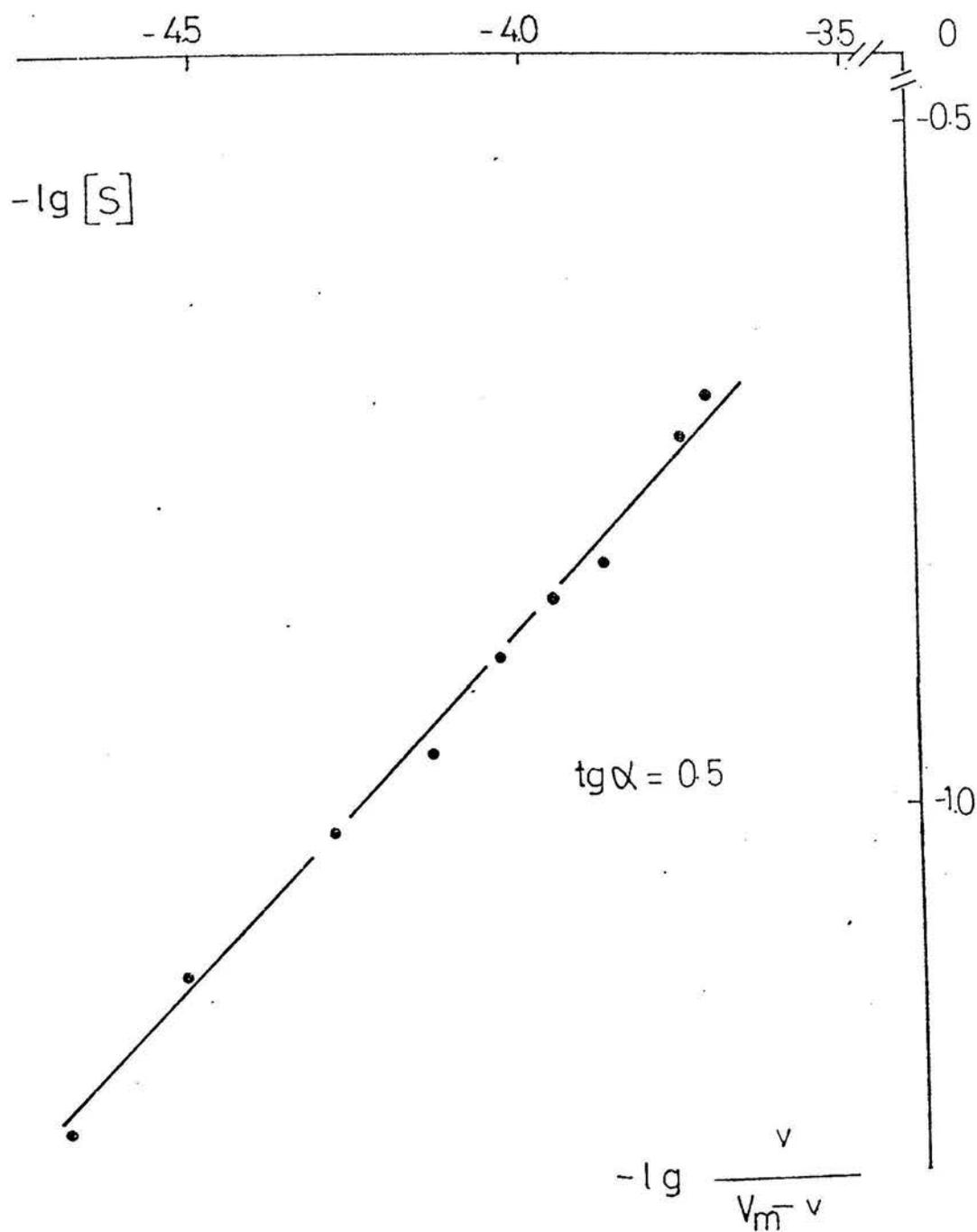


Fig. 37 Representación de Hill correspondiente a la fig 36 a

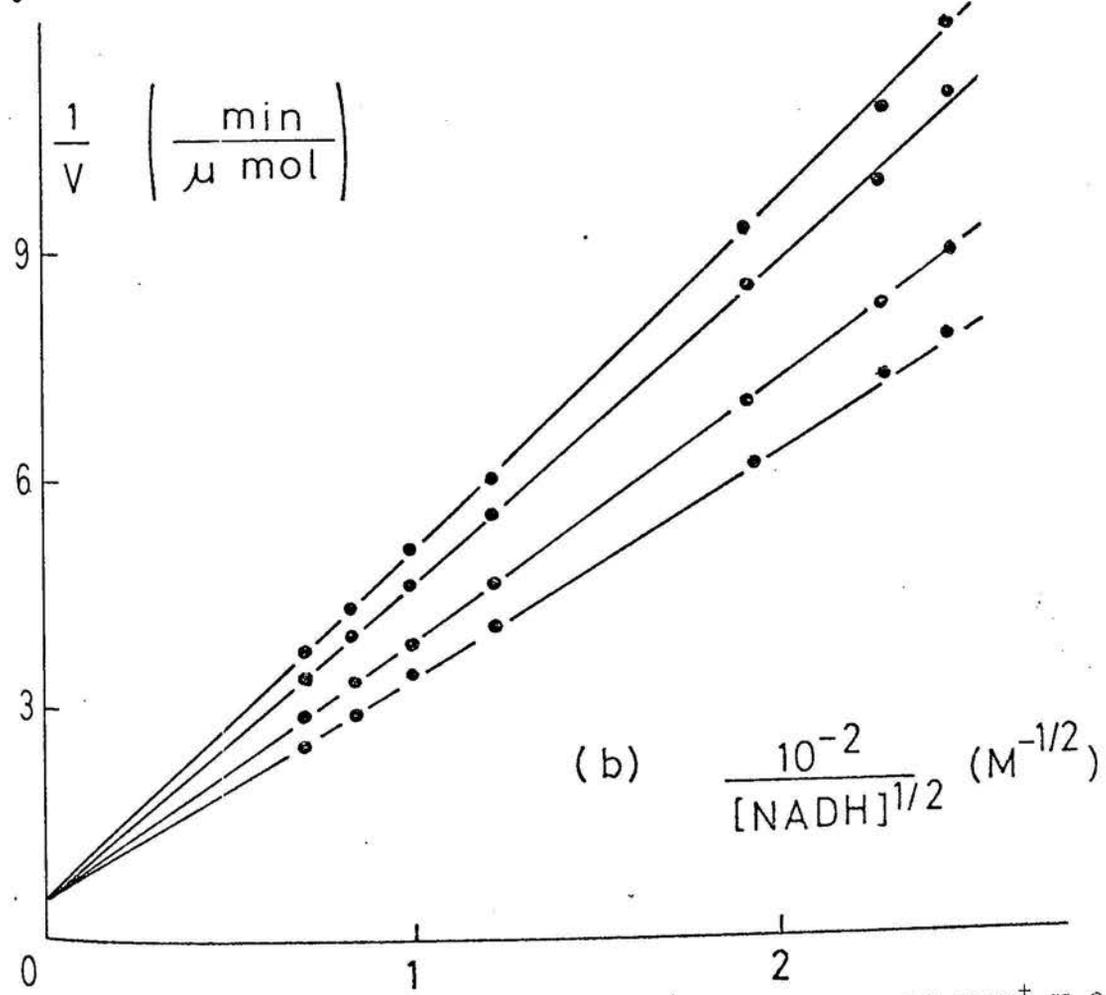
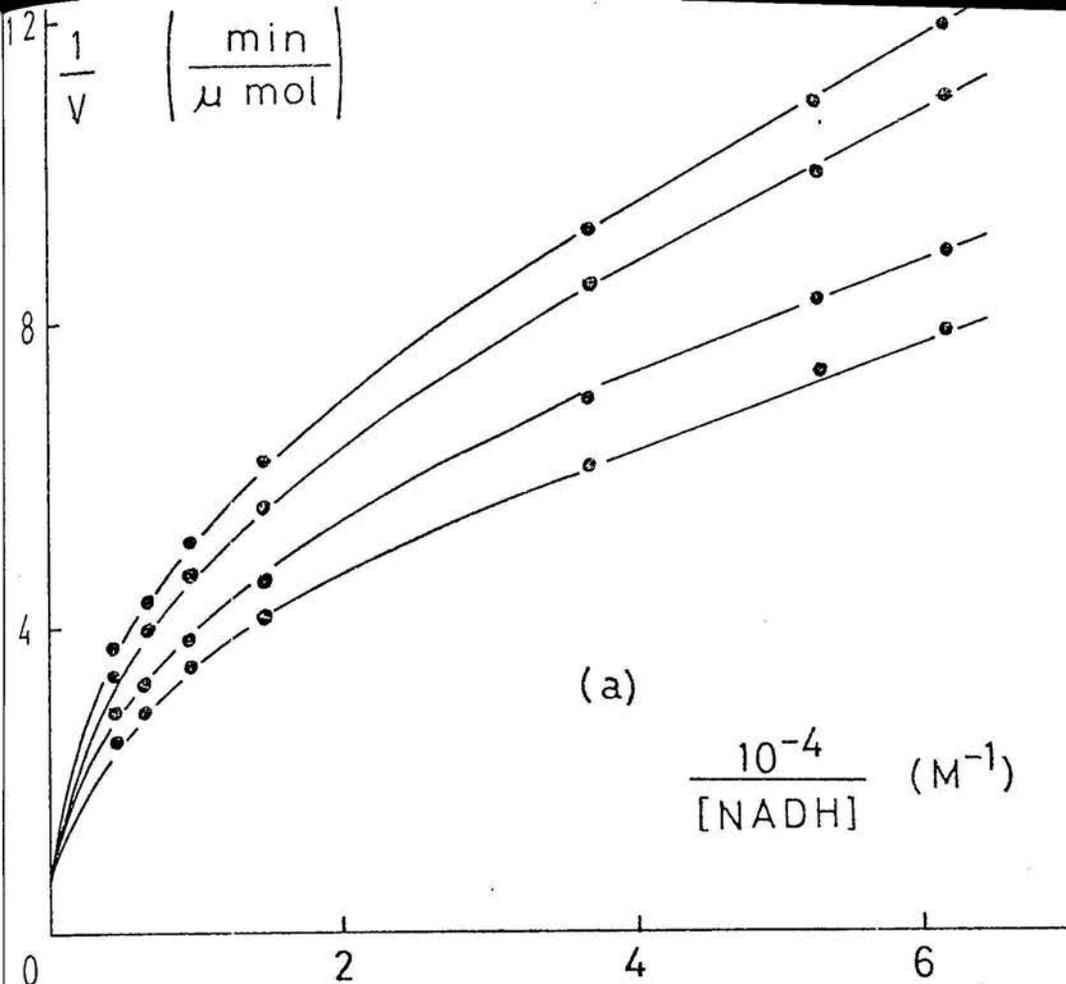


Fig. 38 Inhibición de la XO por NAD^+ (Se $\text{NADH-O}_2\text{-XO-NAD}^+\text{-H}_2\text{O}_2$)
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0 ; $[\text{XO}] = 0,4 \text{ U/ml}$
 De abajo a arriba: $[\text{NAD}^+] 10^5 \text{ M}^{-1} = 0; 1; 5; 10$
 (a) Representación de Lineweaver-Burck. (b) Representación secundaria de $1/v$ frente a $1/[\text{NADH}]^{1/2}$

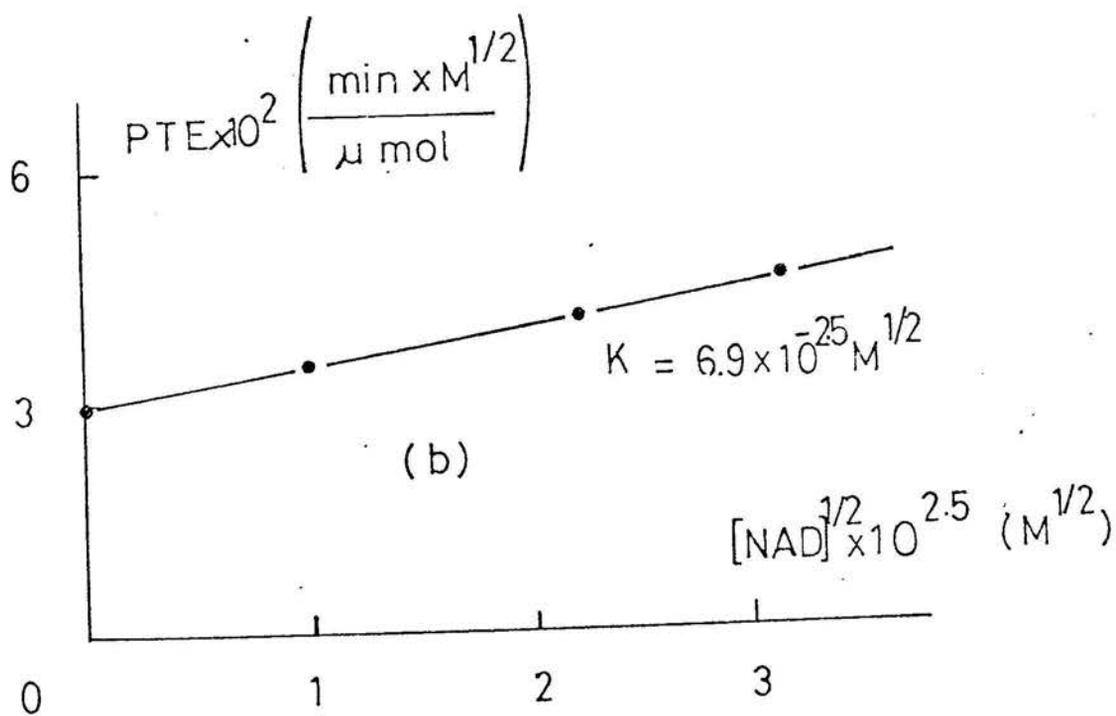
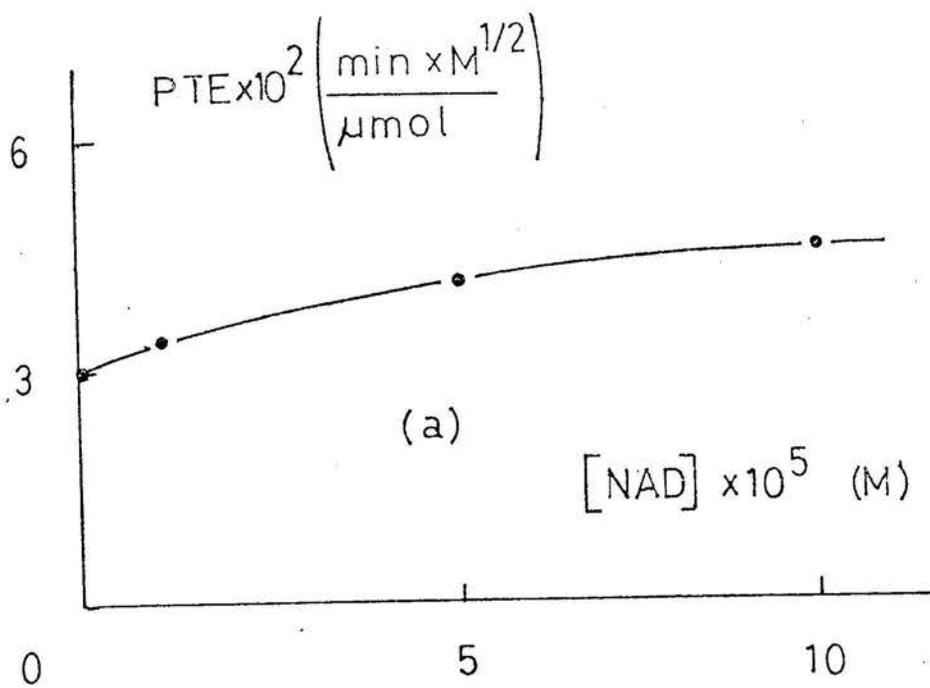


Fig.39(a) Representación secundaria de pendientes frente a $[NAD^+]$ correspondiente a la fig. 38 b

(b) Representación secundaria de pendientes frente a $[NAD^+]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 38 b

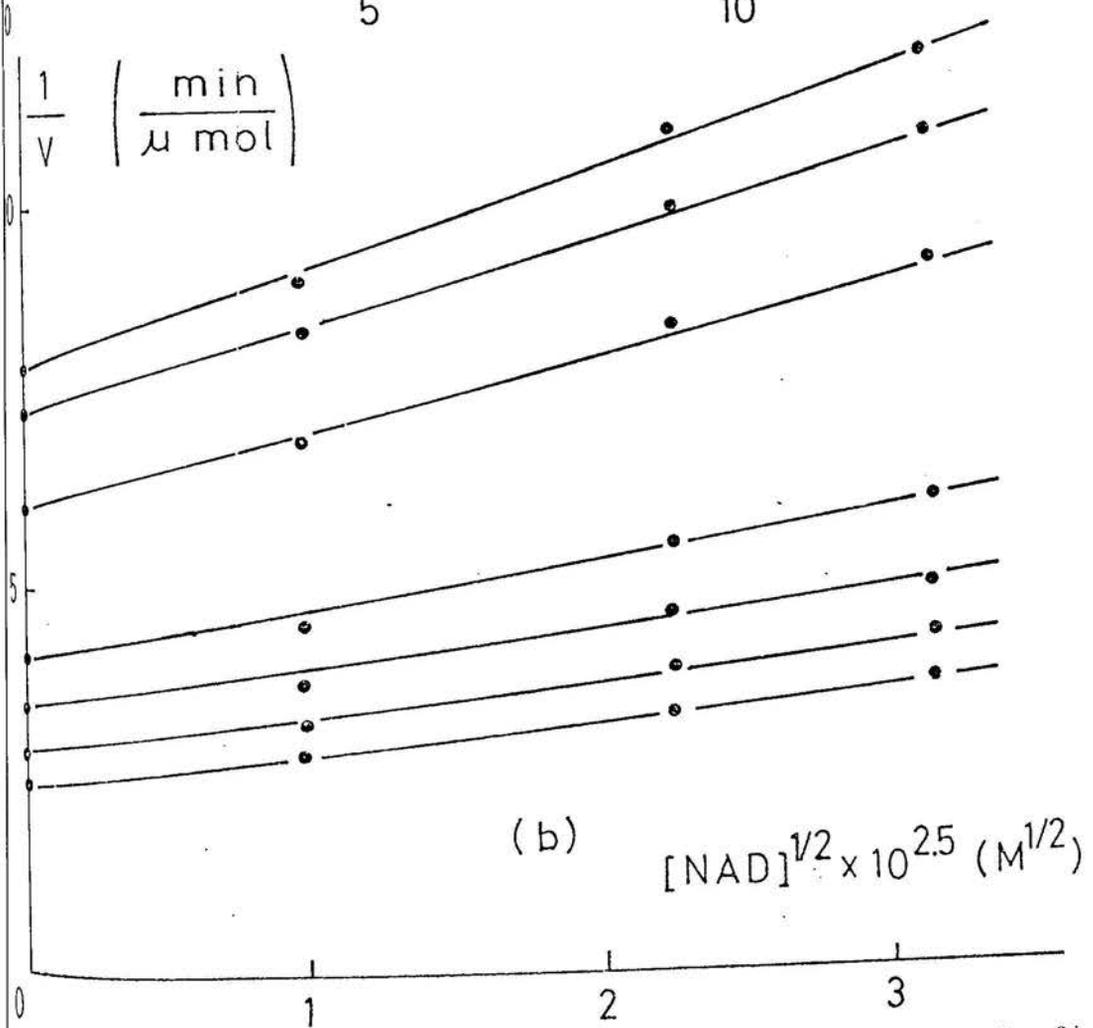
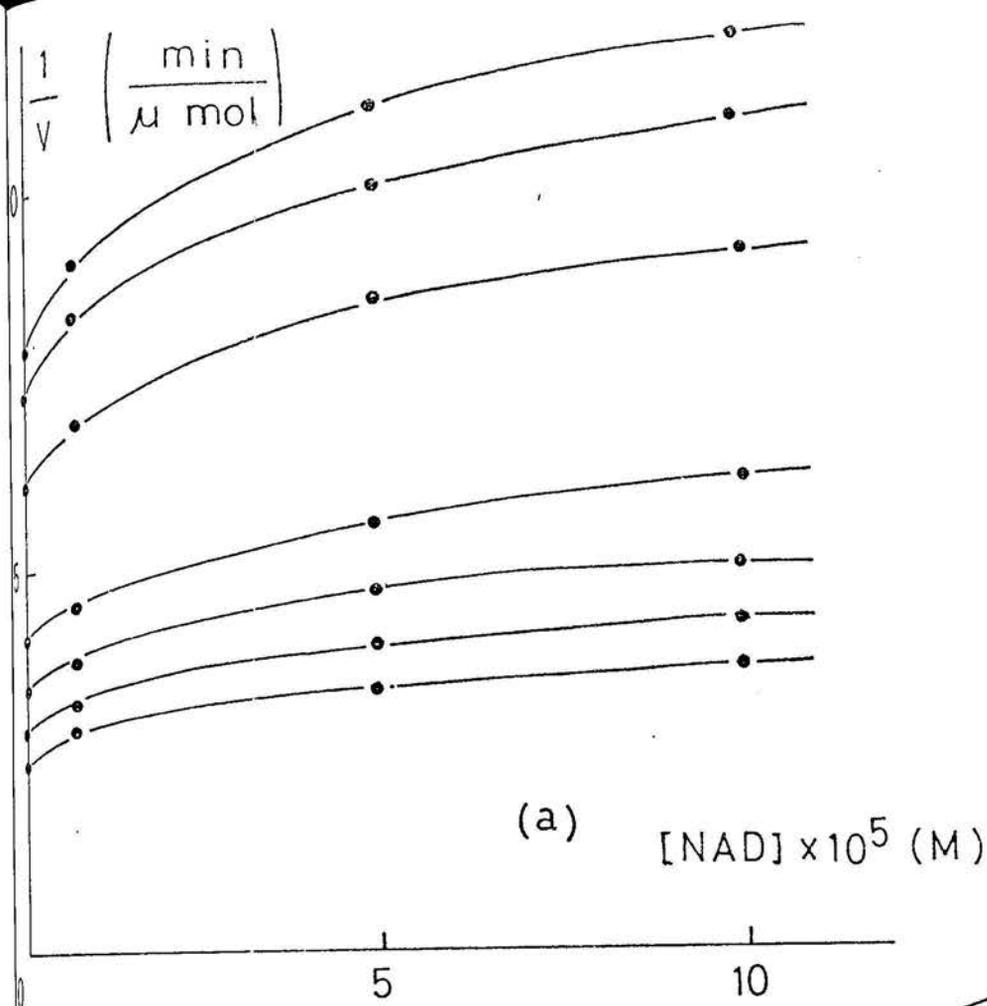


Fig.40 (a) Representación de Dixon correspondiente a la fig.3^a b
 (b) Representación secundaria de $1/v$ frente a $[NAD^+]^{1/2}$
 cotrespondiente a la fig. 3^a b

4.5.11 INHIBICION POR ACIDO URICO DE LA XO (CON RESPECTO AL NADH)

Se ha considerado de interés estudiar el efecto, que el ácido úrico ejerce sobre la actividad de la XO, cuando ésta cataliza la oxidación del NADH a NAD^+ , utilizando el oxígeno como aceptor electrónico, y el carácter de este efecto con respecto al sustrato NADH.

Al efectuar este estudio, se pone de manifiesto que el ácido úrico inhibe muy débilmente a la actividad diáforásica, por lo que al trabajar con concentraciones bajas de NADH es imposible efectuar determinaciones correctas de las diferencias de velocidad entre las muestras con inhibidor y los correspondientes controles en ausencia de éste; el hecho obliga a trabajar con concentraciones de NADH superiores a 8×10^{-5} M.

La representación de ~~Lineweaver~~ Burck no es lineal (fig. 41 a); pero al representar $1/v$ frente a $1/[\text{NADH}]^{1/2}$, la representación se hace lineal, y permite definir que el carácter de la inhibición es acompetitivo (fig. 41 b).

Al representar las intersecciones obtenidas en la fig. 41 b frente a las concentraciones de inhibidor, no aparece linealidad, sino una curva de tipo parabólico (fig. 42 a); tampoco al representar las intersecciones frente a $[\text{ác. úrico}]^2$ aparece la representación de tipo lineal (fig. 42 b). Igual ocurre cuando se efectúa la representación de Dixon, que es parabólica (fig. 43 a) dando lugar igualmente a una representación no lineal, cuando ésta se efectúa frente a $[\text{ác. úrico}]^2$ (fig. 43 b).

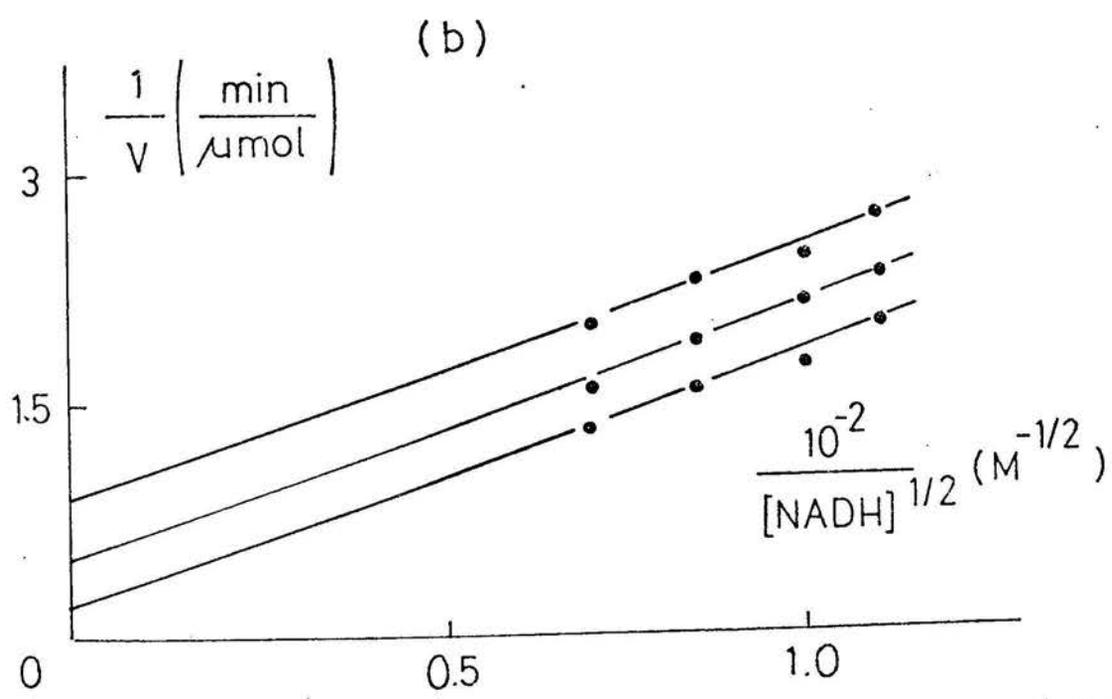
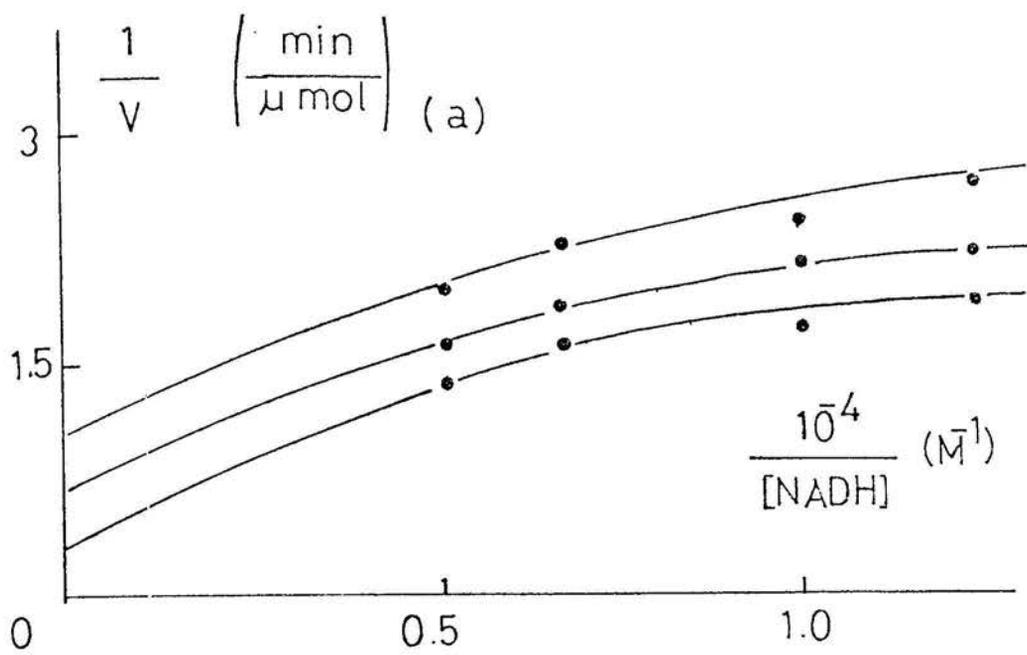


Fig. 41 Inhibición de la XO por ácido úrico ($S \rightleftharpoons \text{NADH} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{XO}} \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$)
 Tampon fosfato sódico pH 6,0 50 mM ; $[\text{XO}] = 0,4 \text{ U/ml}$
 De abajo a arriba: $[\text{ác. úrico}] \times 10^4 \text{ M}^{-1} = 0; 7; 10$
 (a) Representación de Lineweaver-Burck
 (b) Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NADH}]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 41 a

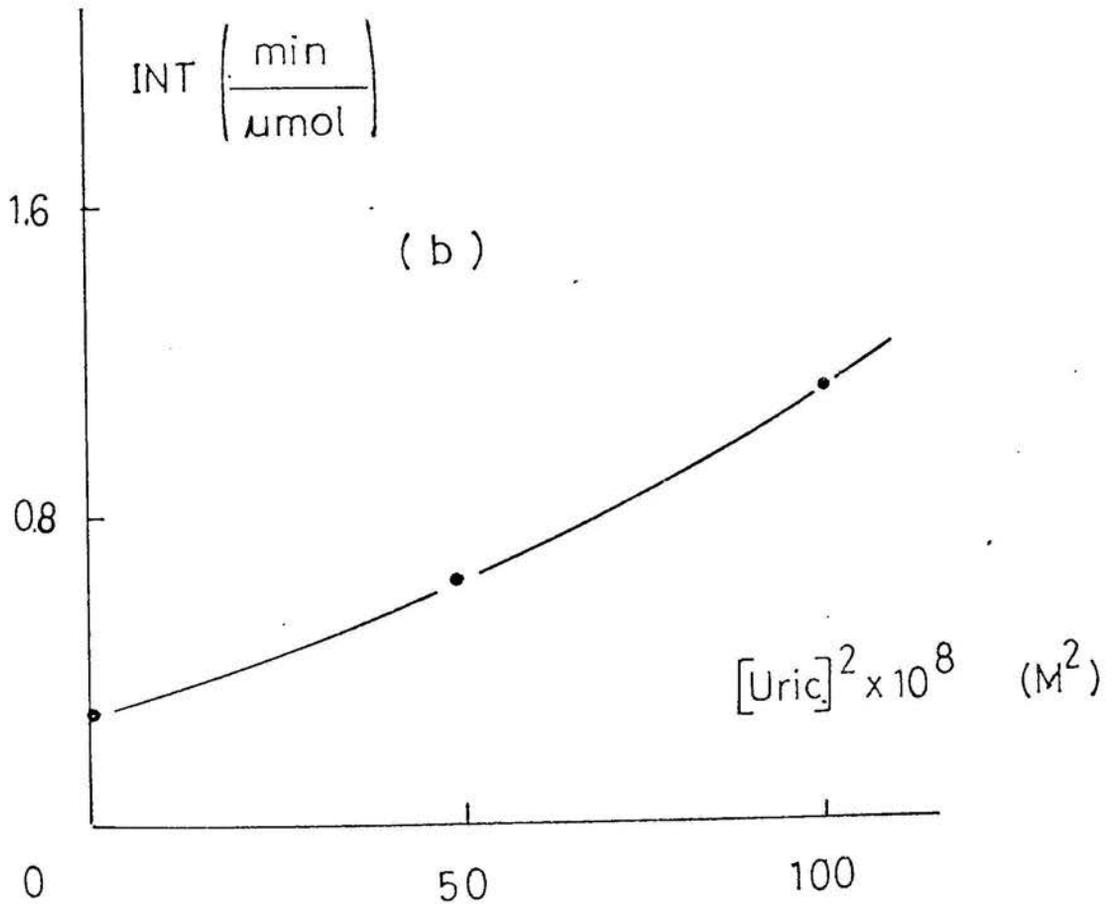
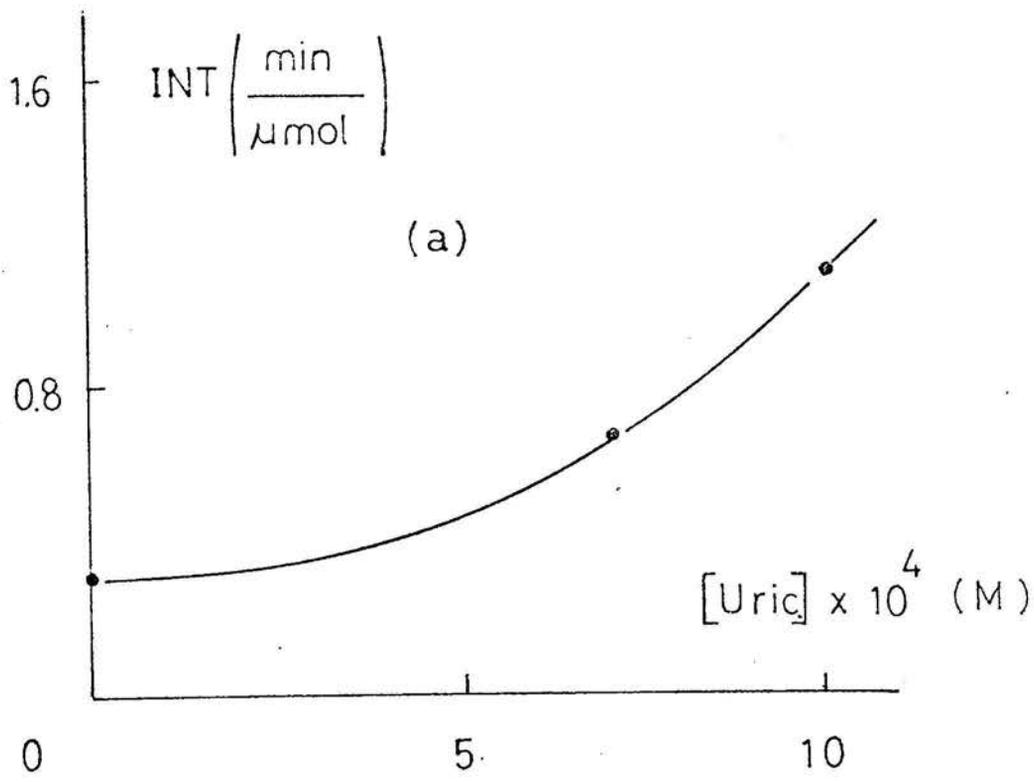


Fig. 42 (a) Representación secundaria de pendientes frente a [ác.úrico] correspondiente a la fig. 41 b
 (b) Representación secundaria de pendientes frente a [ác.úrico]² correspondiente a la fig. 41 b

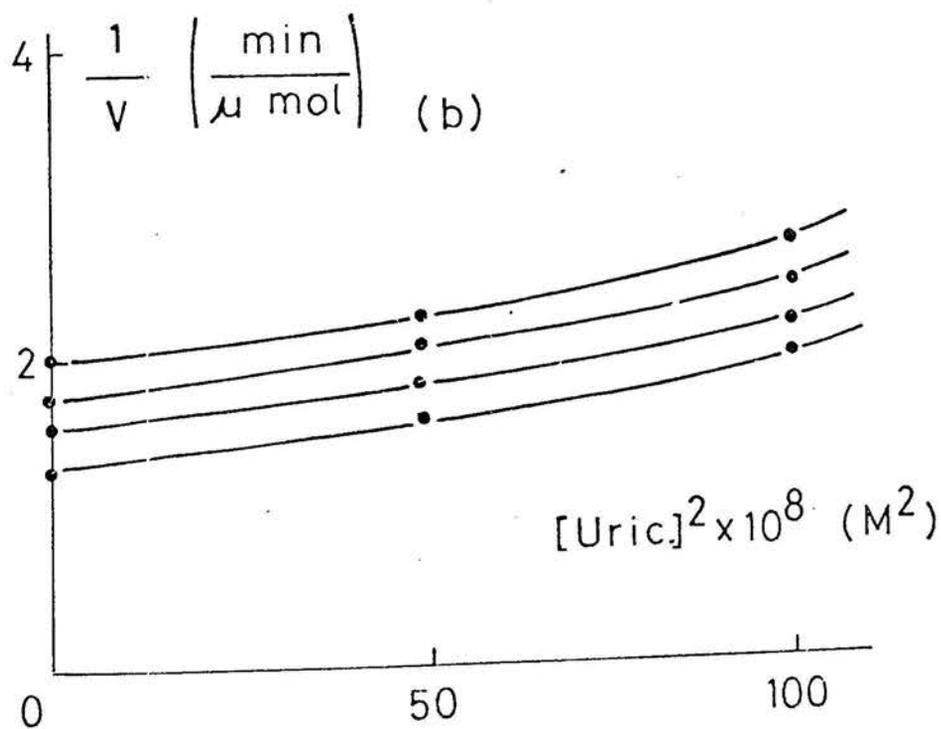
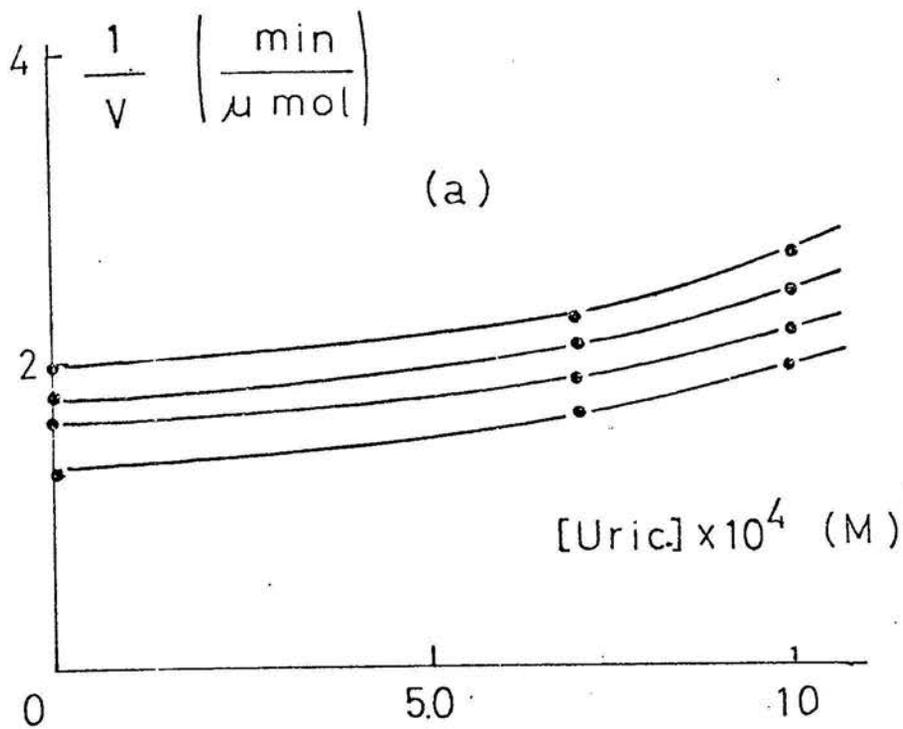


Fig. 43 (a) Representación de Dixon correspondiente a la fig 41 b
 (b) Representación de $1/v$ frente a $[\text{ác.úrico}]^2$ correspondiente a la fig. 41 b

4.5.12 ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA XO

Los resultados obtenidos con la XO permiten formular las sugerencias que se exponen a continuación.

Se observa, en primer lugar, que la representación de las inversas de las velocidades obtenidas con diferentes concentraciones de xantina, es lineal con respecto a las inversas de $[\text{xantina}]^{1/2}$ y que el coeficiente de Hill para este sistema posee valor 0,5. Estos resultados solo son explicables si la ecuación de velocidad es de la forma:

$$(I) \quad v = \frac{v_{\text{máx}} [\text{xantina}]^{1/2}}{K_1 + [\text{xantina}]^{1/2}}$$

Por otra parte, al ser el ácido úrico un inhibidor no competitivo pero de la XO con respecto a la xantina, se ve afectada la intersección y la pendiente de la representación de $1/v$ frente a $1/[\text{xantina}]^{1/2}$ por una misma constante. A su vez, la inhibición es lineal con respecto a $[\text{ác.úrico}]^{1/2}$, lo cual induce a pensar que en presencia de ácido úrico la ecuación se transforma en:

$$(II) \quad v = \frac{v_{\text{máx}} [\text{xantina}]^{1/2}}{(K_1 + [\text{xantina}]^{1/2}) (1 + [\text{ác.úrico}]^{1/2}/K_2)}$$

El hecho de que cuando se considera el NADH como inhibidor del sistema, la inhibición es de tipo acompetitivo, pero no exista linealidad con respecto a ninguna potencia sencilla de la concentración de NADH, debe implicar que el inhibidor afecta a la intersección por medio de un factor complejo en el que interviene tanto $[\text{NADH}]$ como $[\text{NADH}]^{1/2}$, ya que se presenta hiperbólico con respecto a la primera y parabólico con respecto a la segunda, pudiendo expresarse la inhibición en presencia de NADH como indica la ecuación siguiente.

$$(III) \quad v = \frac{V_{\text{máx}} [\bar{x}\text{antina}]^{1/2}}{K_1 + [\bar{x}\text{antina}]^{1/2} (1 + K_3 [\bar{\text{NADH}}]^{1/2} + K_4 [\bar{\text{NADH}}])}$$

en la que K_3 y K_4 no son determinables por métodos sencillos.

Cuando la XO actúa sobre la hipoxantina el sistema se adapta a una ecuación como la (I).

En este caso, existe inhibición por exceso de sustrato; esta inhibición es lineal con respecto a $[\bar{\text{hipoxantina}}]^{1/2}$, lo que da lugar a una ecuación como:

$$(IV) \quad v = \frac{V_{\text{máx}} [\bar{\text{hipoxantina}}]^{1/2}}{K_5 + [\bar{\text{hipoxantina}}]^{1/2} + K_6 [\bar{\text{hipoxantina}}]}$$

La inhibición por ácido úrico es de tipo no competitivo paralela- do con respecto a la hipoxantina, no adaptándose en este caso a la linealidad con respecto a $[\bar{\text{ác. úrico}}]$ ni a $[\bar{\text{ác. úrico}}]^2$. La ecuación adecuada es la siguiente, debido a la representación de intersecciones y pendientes.

$$(V) \quad v = \frac{V_{\text{máx}} [\bar{\text{hipoxantina}}]^{1/2}}{\text{denominador}_1}$$

$$\text{siendo } \text{denominador}_1 = \left(1 + \frac{[\bar{\text{ác. úrico}}]^{1/2}}{K_7}\right) K_5 +$$

$$+ [\bar{\text{hipoxantina}}]^{1/2} \left(1 + \frac{[\bar{\text{ác. úrico}}]^{1/2}}{K_8} + \frac{[\bar{\text{ác. úrico}}]}{K_9} + \frac{[\bar{\text{ác. úrico}}]^{3/2}}{K_{10}}\right)$$

Los resultados hasta ahora descritos se adaptan a un esquema como el de la fig. 44, la cual está de acuerdo con la deducción teórica por el método de King y Altman (106) (107).

Cuando se trata de la reacción diaforásica a pH 6, la ecuación de velocidad es análoga a la (I), lo cual está de acuerdo con la linealidad en la representación de v/v frente a $1/[\text{NADH}]^{1/2}$, y con el valor de 0,5 en la representación de Hill.

La inhibición por producto NAD^+ es competitiva y se adapta a la linealidad frente a $[\text{NAD}^+]^{1/2}$, lo que está de acuerdo con la siguiente ecuación:

(VI)

$$v = \frac{v_{\text{máx}} [\text{NADH}]^{1/2}}{K_{11} (1 + [\text{NAD}^+]^{1/2} / K_{12}) + [\text{NADH}]^{1/2}}$$

Si se considera al ácido úrico como inhibidor del sistema, la inhibición es acompetitiva no lineal con respecto a $[\text{ác. úrico}]^2$, dando lugar a una ecuación como:

(VII)

$$v = \frac{v_{\text{máx}} [\text{NADH}]^{1/2}}{\text{denominador}_2}$$

$$\text{siendo } \text{denominador}_2 = K_{11} + [\text{NADH}]^{1/2} \left(1 + \frac{[\text{ác. úrico}]^{1/2}}{K_{13}} + \frac{[\text{ác. úrico}]}{K_{14}} + \frac{[\text{ác. úrico}]^2}{K_{15}} \right),$$

Estos resultados corresponden al mecanismo reflejado en la fig. 45, e igualmente han sido comprobados teóricamente (106) (107).

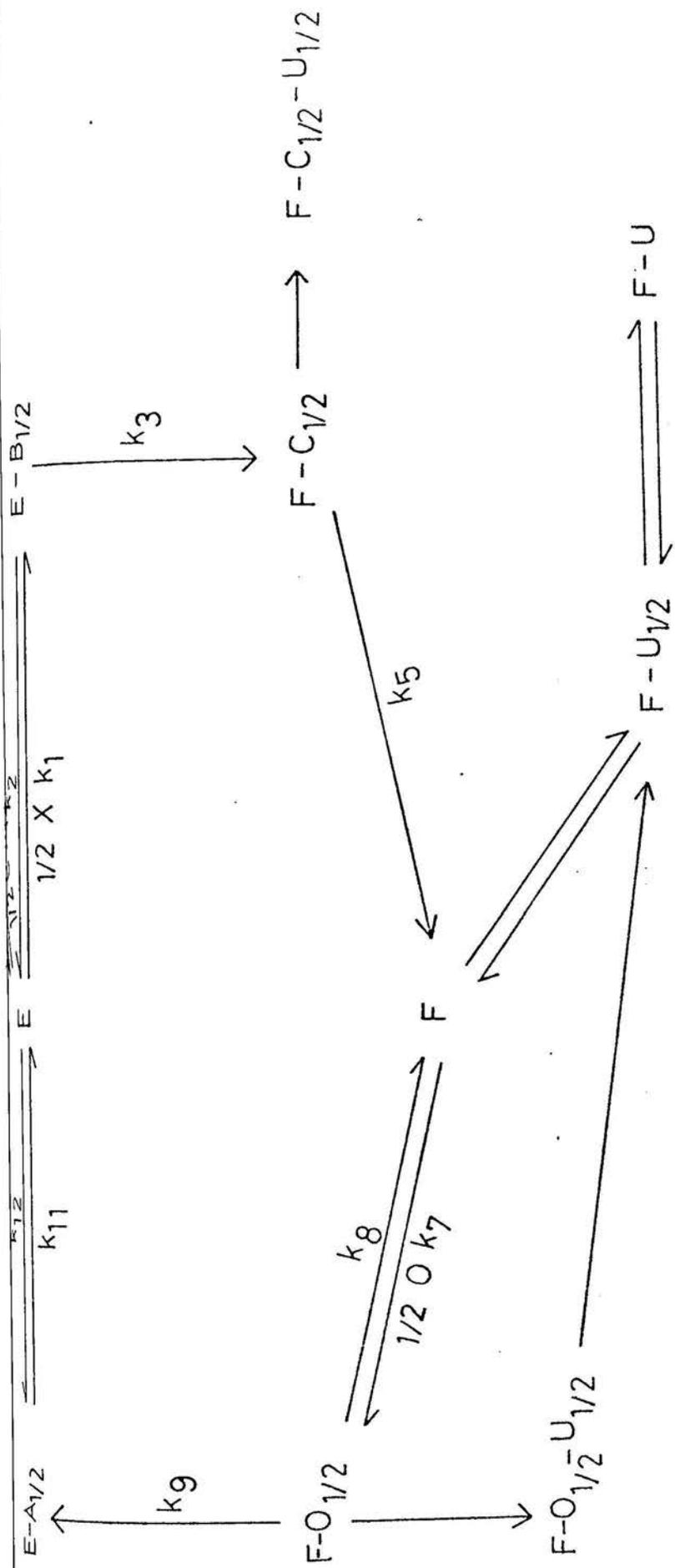


Fig. 45 Mecanismo reaccional de la XO (Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0)
 B= NADH ; C= NAD⁺ ; U= ácido úrico ; O= O₂ ; A= H₂O ; E= XO oxidada ; F= XO reducida

4.6 ESTUDIOS CINETICOS SOBRE LA XDH

Una vez establecido el comportamiento cinético de la XO, se procedió a establecer el que exhibe la XDH, en las distintas reacciones que cataliza: diaforásica, oxidásica y deshidrogenasica, así como la reacción de oxidación de la xantina utilizando el ácido úrico como aceptor electrónico.

4.6.1 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA XDH EN EL SISTEMA $\text{NADH-O}_2\text{-XDH-NAD}^+\text{-H}_2\text{O}_2$

Debido a que no fue posible establecer el pH óptimo para esta reacción (ver 4.5.9), se escogió el de 6 como pH de trabajo.

Se efectuó en primer lugar, la determinación de la actividad para distintas concentraciones de sustrato NADH hasta 5×10^{-4} M. No fue posible utilizar concentraciones superiores debido fundamentalmente a la baja sensibilidad del método espectrofotométrico, en la determinación de los incrementos de absorbancia cuando los valores de ésta son elevados.

Al representar los resultados por el método Lineweaver-Burck, se obtuvo aparente linealidad (fig. 46 a) ; a partir de concentraciones de NADH superiores a 1×10^{-4} M, puede apreciarse el fenómeno de inhibición de la XDH por exceso del sustrato.

4.6.2 INHIBICION POR NAD^+ DE LA XDH

Se ha estudiado el efecto que el producto de la reacción, el NAD^+ , ejerce sobre la actividad catalítica de la XDH.

Al efectuar las representaciones gráficas de Lineweaver-Burck, apareció una inhibición de tipo no competitivo mezclado (fig. 47 a). Las representaciones secundarias de las intersecciones

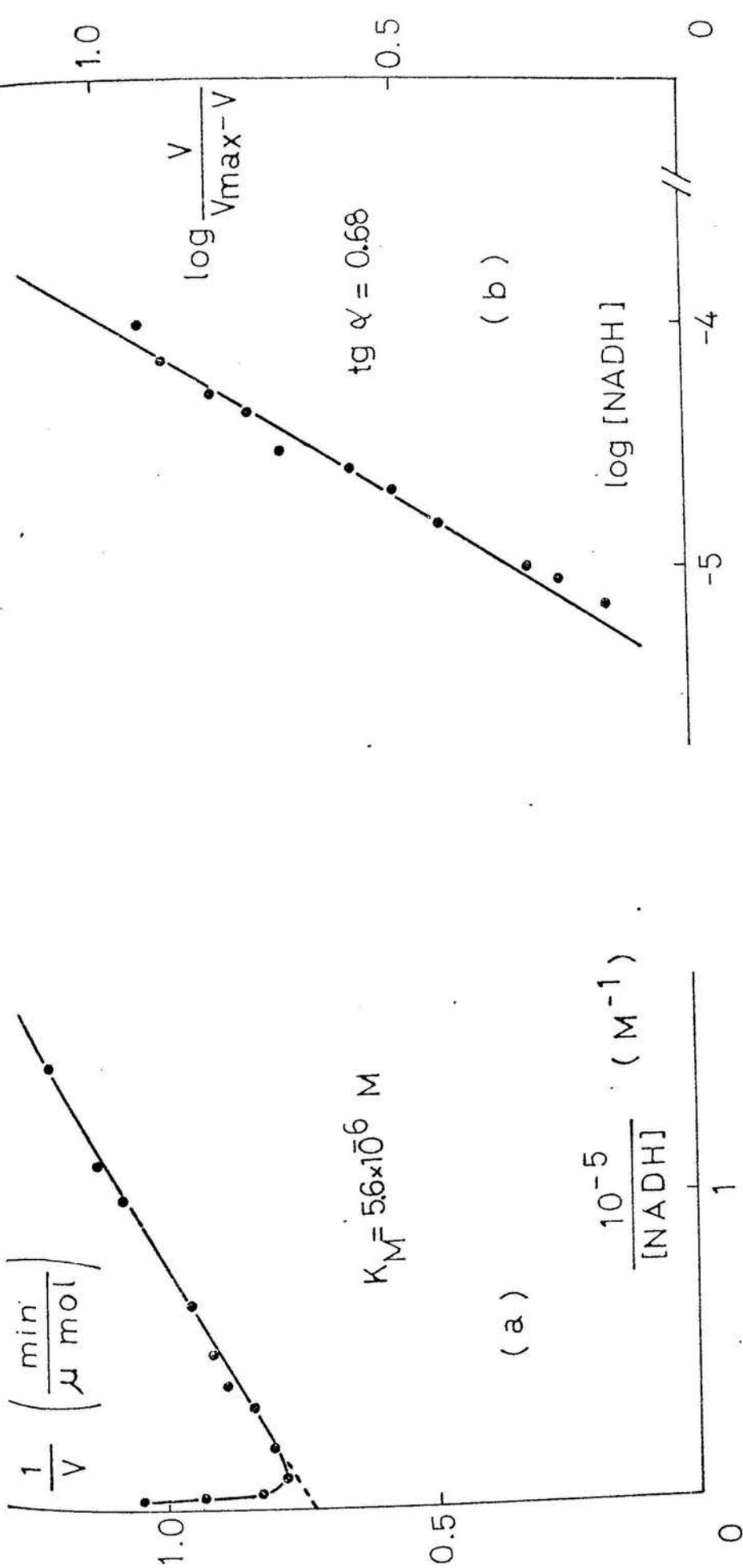


Fig. 46(a) Representación de Lineweaver-Burck (Se NADH-O_2 -XDH- NAD^+ - H_2O_2)

Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0 ; $[\text{XDH}] = 16 \text{ U/ml}$

(b) Representación de Hill correspondiente a la fig. 46 a

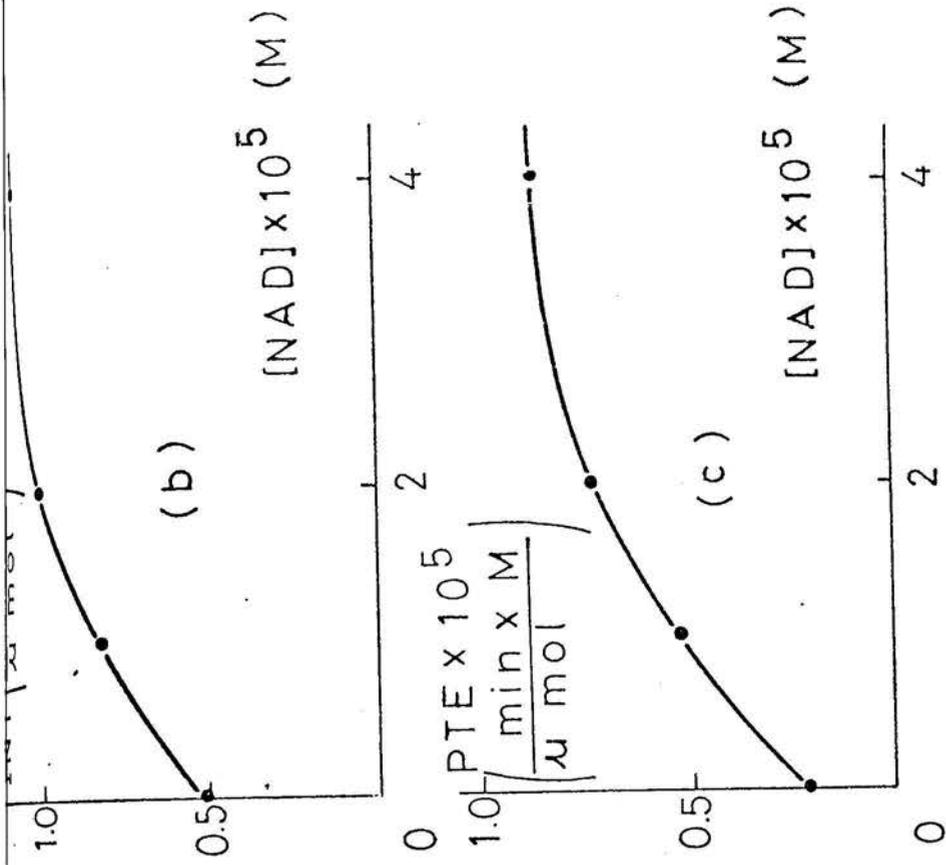
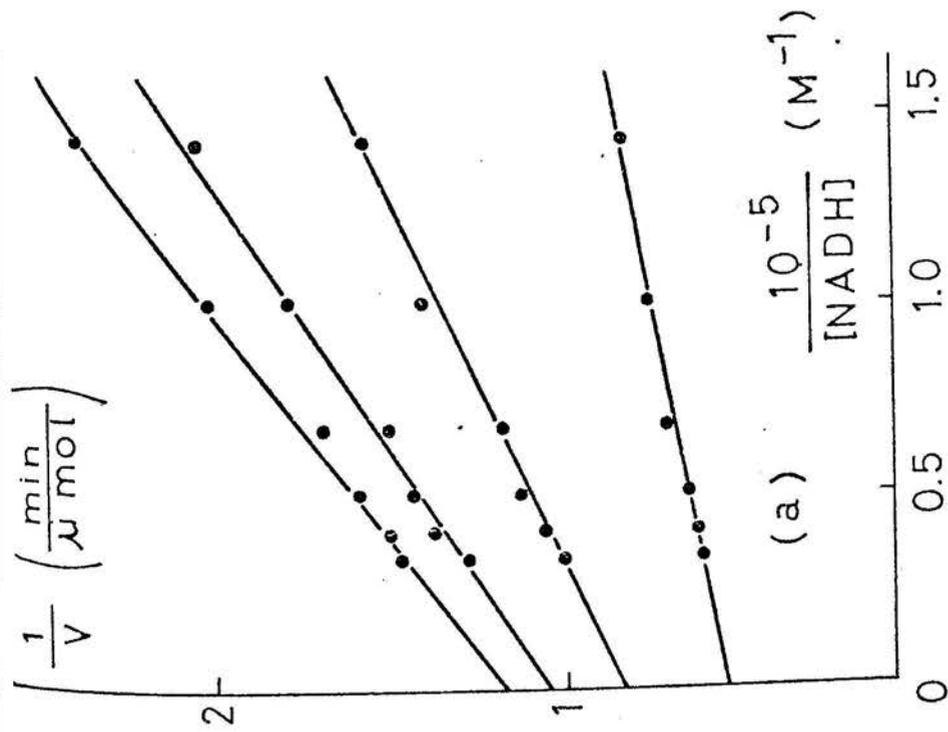


Fig. 47 Inhibición de la XDH por NAD^+ (Se $\text{NADH-O}_2\text{-XDH-NAD}^+\text{-H}_2\text{O}_2$)
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0 ; $[\text{XDH}] = 16 \text{ U/ml}$
 De abajo a arriba: $[\text{NAD}^+] \times 10^5 \text{ M}^{-1} = 0; 1; 2; 4$

(a) Representación de Lineweaver-Burck

(b) Representación secundaria de intersecciones frente a $[\text{NAD}^+]$ correspondiente a la fig. 47 a

(c) Representación secundaria de pendientes frente a $[\text{NAD}^+]$ correspondiente a la fig. 47 a

y de las pendientes frente a $[\text{NAD}^+]$, son de carácter aparentemente hiperbólico, con curvas convexas (Fig. 47 b y 47 c).

Con objeto de profundizar en el conocimiento de la inhibición y del comportamiento del enzima en distintas condiciones, se procedió a determinar el efecto que las concentraciones de NAD^+ que provocan inhibición, ejercen sobre la actividad catalítica en presencia de concentraciones variables de NADH , incluidas las que inhiben por exceso de sustrato. La representación de Lineweaver-Burck (fig. 48 a) conduce a la obtención de resultados análogos a los obtenidos en la fig. 46 a para la recta control. Cuando había NAD^+ en el medio de reacción, se obtuvieron velocidades anormalmente altas en el margen de NADH comprendido entre 3×10^{-5} y 1×10^{-4} M, siendo este incremento más acusado al ser mayor la concentración de NAD^+ . Cuando la concentración de NADH es superior a 1×10^{-4} M la inhibición por exceso de sustrato se presenta tanto en presencia como en ausencia de NAD^+ .

En la fig. 48 a, se observa la dificultad de determinación del tipo de inhibición que ejerce el NAD^+ y sus correspondientes constantes cinéticas, dado que al no obtenerse una representación de tipo lineal, no es posible efectuar las correspondientes representaciones secundarias. Para resolver esta dificultad se presentaron dos posibles soluciones. Una de ellas consiste en ajustar las curvas obtenidas mediante distintas ecuaciones técnicas por el método de los mínimos cuadrados, con lo cual se obtienen los valores de los coeficientes que afectan a éstas y que corresponden a distintas combinaciones de los parámetros cinéticos. La otra es deducir un tipo de representación mediante el cual sea posible obtener representaciones lineales, lo que conduce a un método de trabajo con menores dificultades al poder obtener los resultados de forma gráfica, sin que sea preciso recurrir a tediosos procesos de cálculo.

El estudio de las deflexiones que aparecen en la fig. 48 a condujo a efectuar las representaciones de Hill para estas experiencias, utilizando los valores de velocidad máxima calcula-

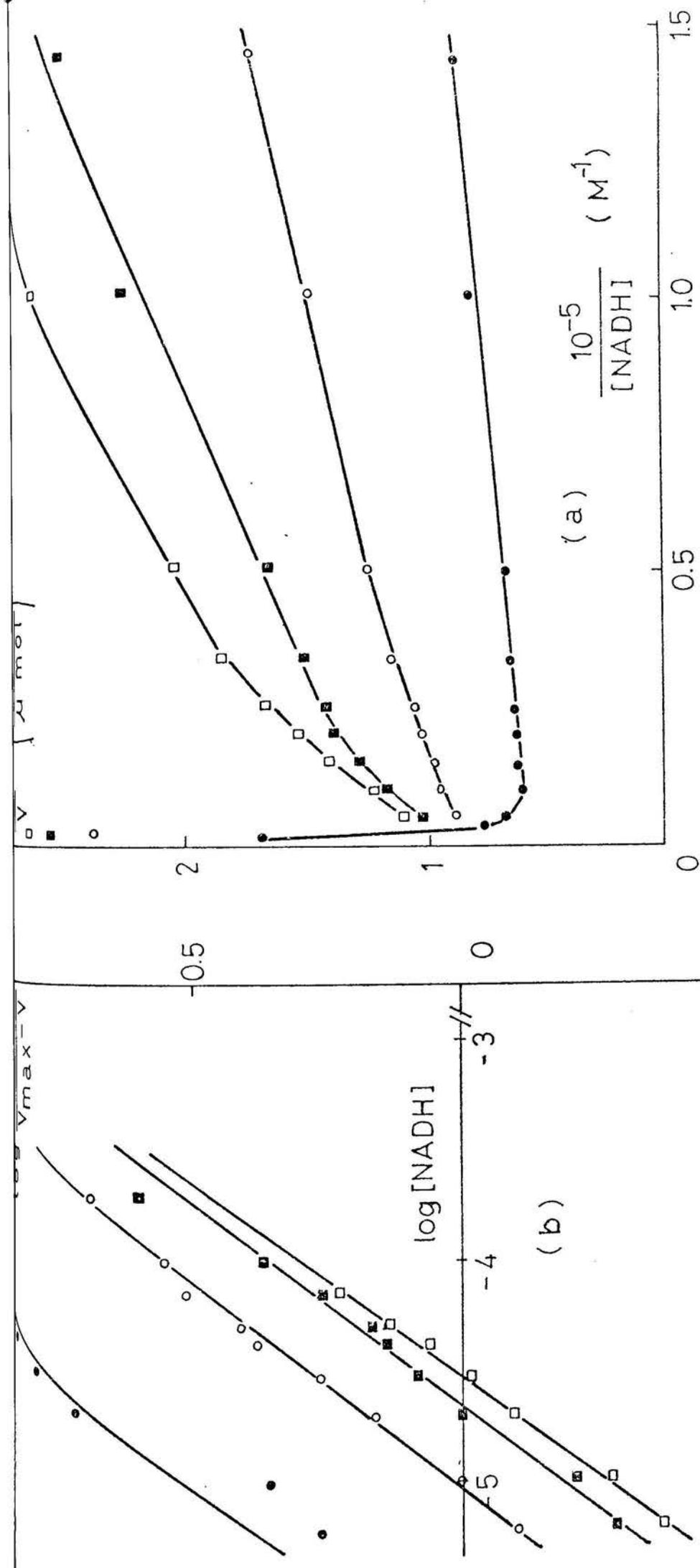


Fig. 48 Inhibición de la XDH por NAD⁺ (Se NADH-O₂-XDH-NAD⁺-H₂O₂)

Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0 ; [XDH] = 16 U/ml

De abajo a arriba: [NAD⁺] $\times 10^5 M^{-1}$ = 0; 1,5; 4; 6

(a) Representación de Lineweaver-Burck

(b) Representación de Hill correspondiente a la fig. 48 a

dos mediante la prolongación de las curvas hasta el punto de intersección con el eje de ordenadas. Se obtuvieron para estas representaciones rectas de pendiente 0,5 (fig. 48 b). Este valor distinto de la unidad, lógico al haberse obtenido representaciones de Lineweaver-Burk no lineales, llevó a efectuar análogas representaciones para las experiencias de determinación de los parámetros cinéticos, obteniéndose en este caso rectas de pendiente 0,5 (fig. 46 b).

El valor de pendiente 0,5, que se halla en las citadas representaciones de Hill, induce a suponer que la concentración de NADH en la ecuación de velocidad debe venir afectada por el exponente $1/2$ y que en caso de existir términos de grado distinto éstos deben venir afectados por un coeficiente lo suficientemente pequeño para que no tengan significación en la velocidad, ya que de no ser así este hecho se reflejaría en una desviación apreciable de la linealidad en las representaciones de Hill.

Estos resultados llevaron a ensayar la representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NADH}]^{1/2}$, utilizando los datos correspondientes a la fig. 48 a. Se obtuvo mediante esta representación, linealidad en la zona no correspondiente a inhibición por exceso de sustrato (fig. 49), la cual se observa si las concentraciones de NADH son superiores a 1×10^{-4} M. De esta forma los resultados correspondientes a las fig. 46 a y 47 a, que proporcionaban resultados lineales, al efectuar la representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NADH}]^{1/2}$ da igualmente lugar a representaciones aparentemente lineales, si bien el valor de $V_{\text{máx}}$ se modifica sustancialmente (fig. 50 a y 50 b).

Las representaciones de Hill obtenidas para los valores de $V_{\text{máx}}$ deducidos de la última representación ($1/v$ frente a $[\text{NADH}]^{1/2}$) proporcionaron igualmente rectas de pendiente $1/2$, lo cual confirma la hipótesis de que el sustrato NADH, viene afectado por el exponente $1/2$ en la ecuación de velocidad para esta reacción.

Puede observarse en la fig. 49, que el NAD^+ actuando como inhibidor modifica la intersección y la pendiente. La representa-

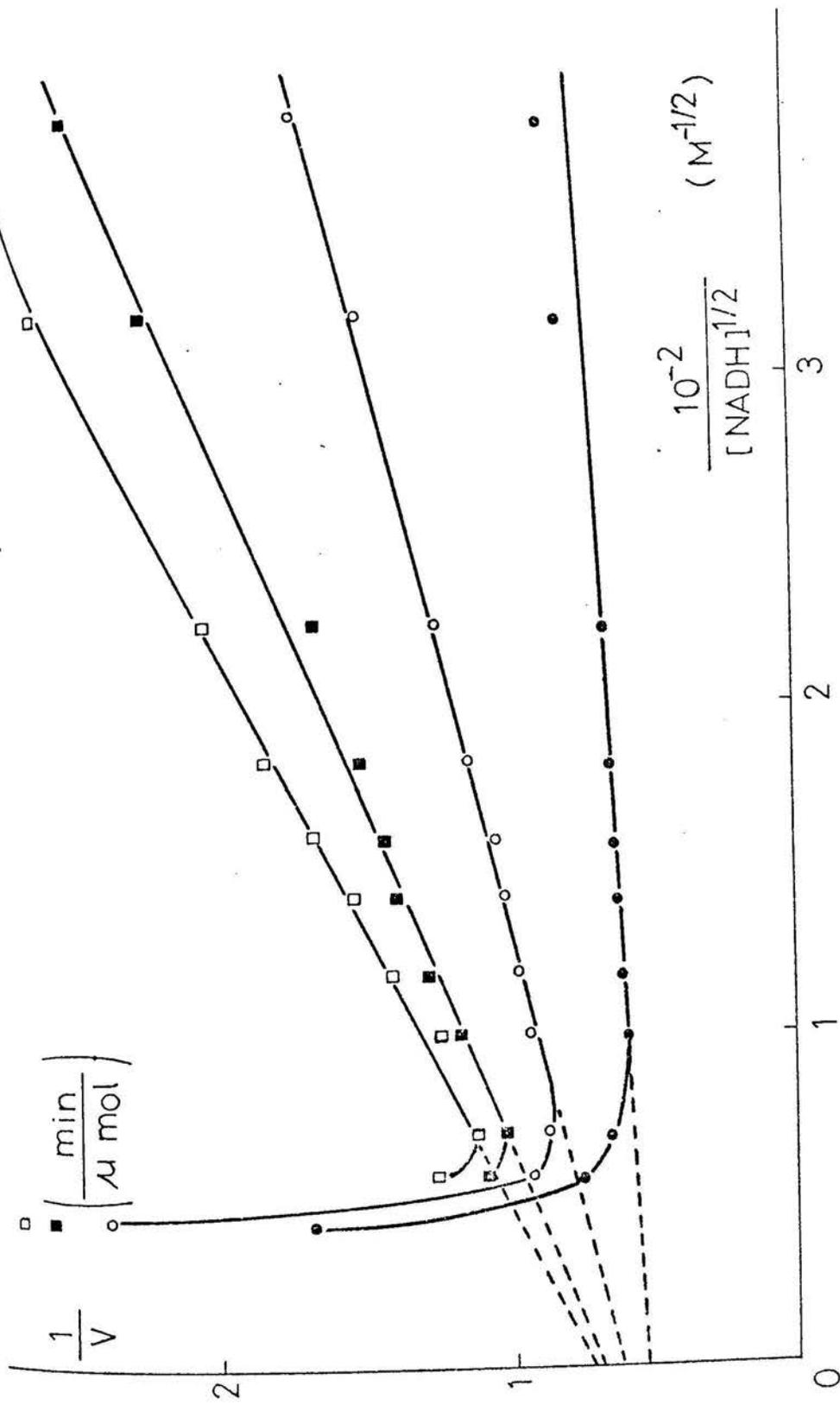


Fig. 49 Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NADH}]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 48 a

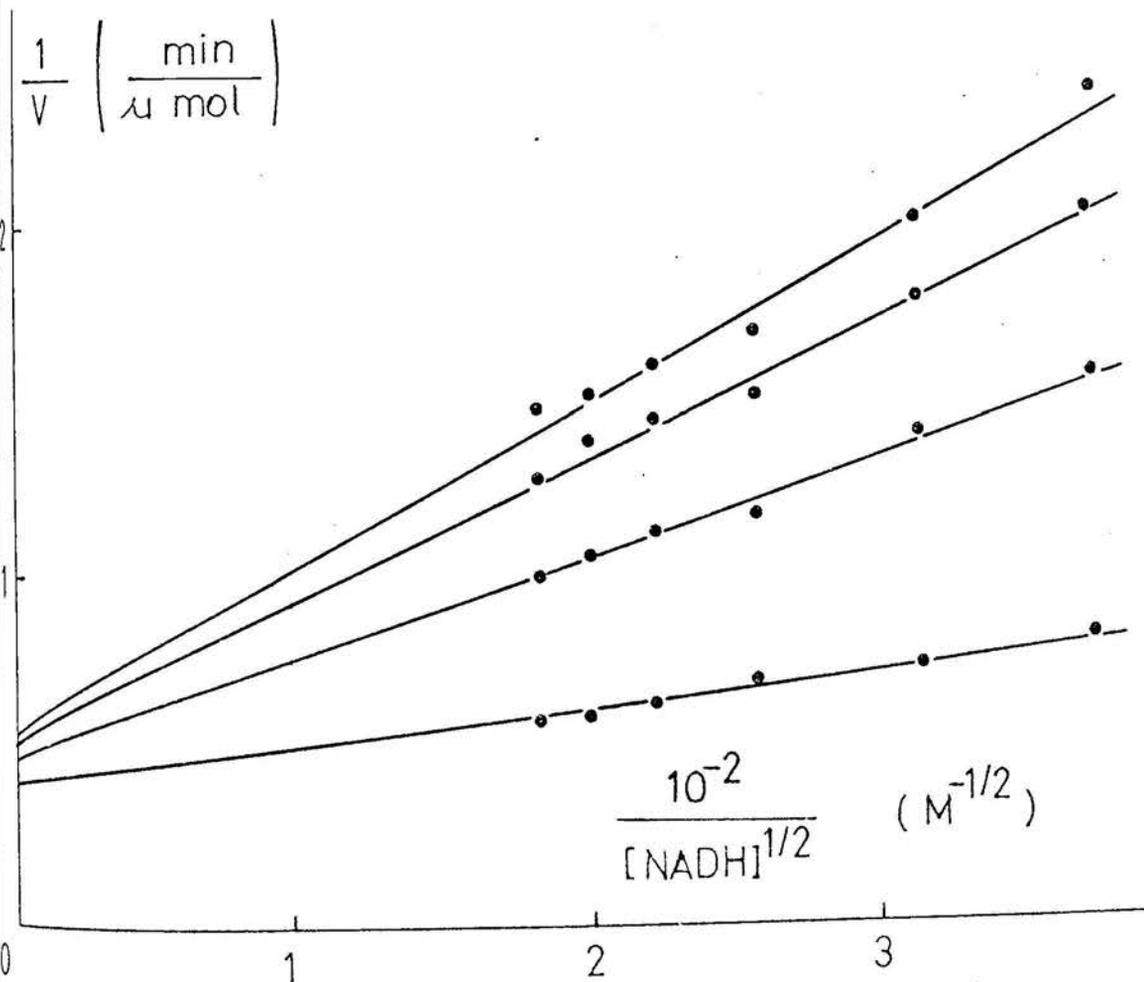
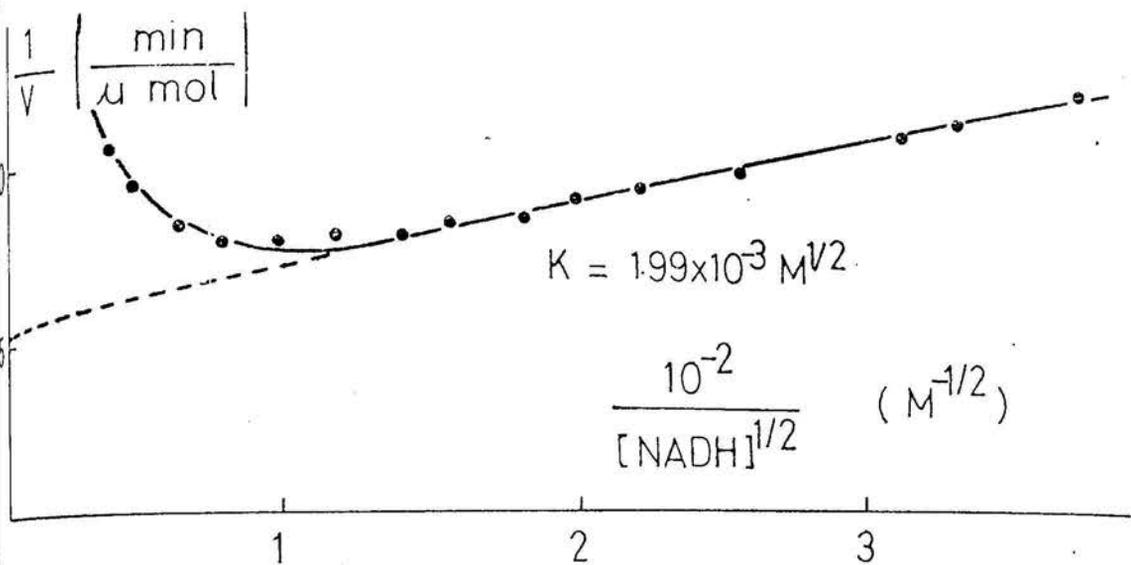


Fig. 50 (a) Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NADH}]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 46 a
 (b) Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NADH}]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 47 a

ción secundaria de las intersecciones frente a $[\overline{\text{NAD}}^+]$, no es lineal, lo cual indica que la ecuación de velocidad en la que figura el producto inhibitor no contiene fundamentalmente términos afectados del exponente unidad, que correspondan al producto de la reacción (fig. 51 a). Sin embargo, al efectuar la representación de $1/v$ frente a $[\overline{\text{NAD}}^+]^{1/2}$ los resultados que se obtienen son lineales (fig. 51 b) lo que implica la existencia de términos del tipo $[\overline{\text{NAD}}^+]^{1/2}$ que afectan a la intersección. Así pues, el factor que afecta a la intersección deberá ser de la forma

$$1 + c [\overline{\text{NAD}}^+]^{1/2}$$

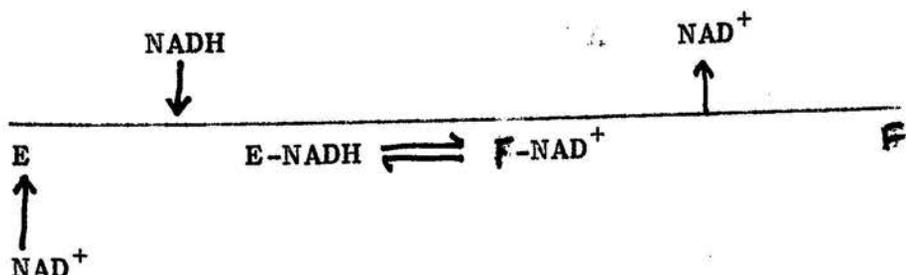
Cuando se trata de las pendientes, la representación de éstas no es lineal ni frente a $[\overline{\text{NAD}}^+]$ ni frente a $[\overline{\text{NAD}}^+]^{1/2}$ (fig. 51 c y 51 d). Las curvas obtenidas en esta representación, una convexa y la otra cóncava respectivamente, llevan a postular que la pendiente en la ecuación de velocidad vendrá afectada por un factor del tipo

$$1 + m [\overline{\text{NAD}}^+]^{1/2} + p [\overline{\text{NAD}}^+]$$

De esta forma, considerando únicamente la inhibición por NAD^+ , se obtiene la expresión siguiente para la ecuación de velocidad

$$1/v = a (1 + c [\overline{\text{NAD}}^+]^{1/2}) + \frac{b}{[\overline{\text{NADH}}]^{1/2}} (1 + m [\overline{\text{NADH}}]^{1/2} + p [\overline{\text{NAD}}^+])$$

Esta ecuación, está de acuerdo con un esquema reaccional, según la nomenclatura de Cleland, tal como



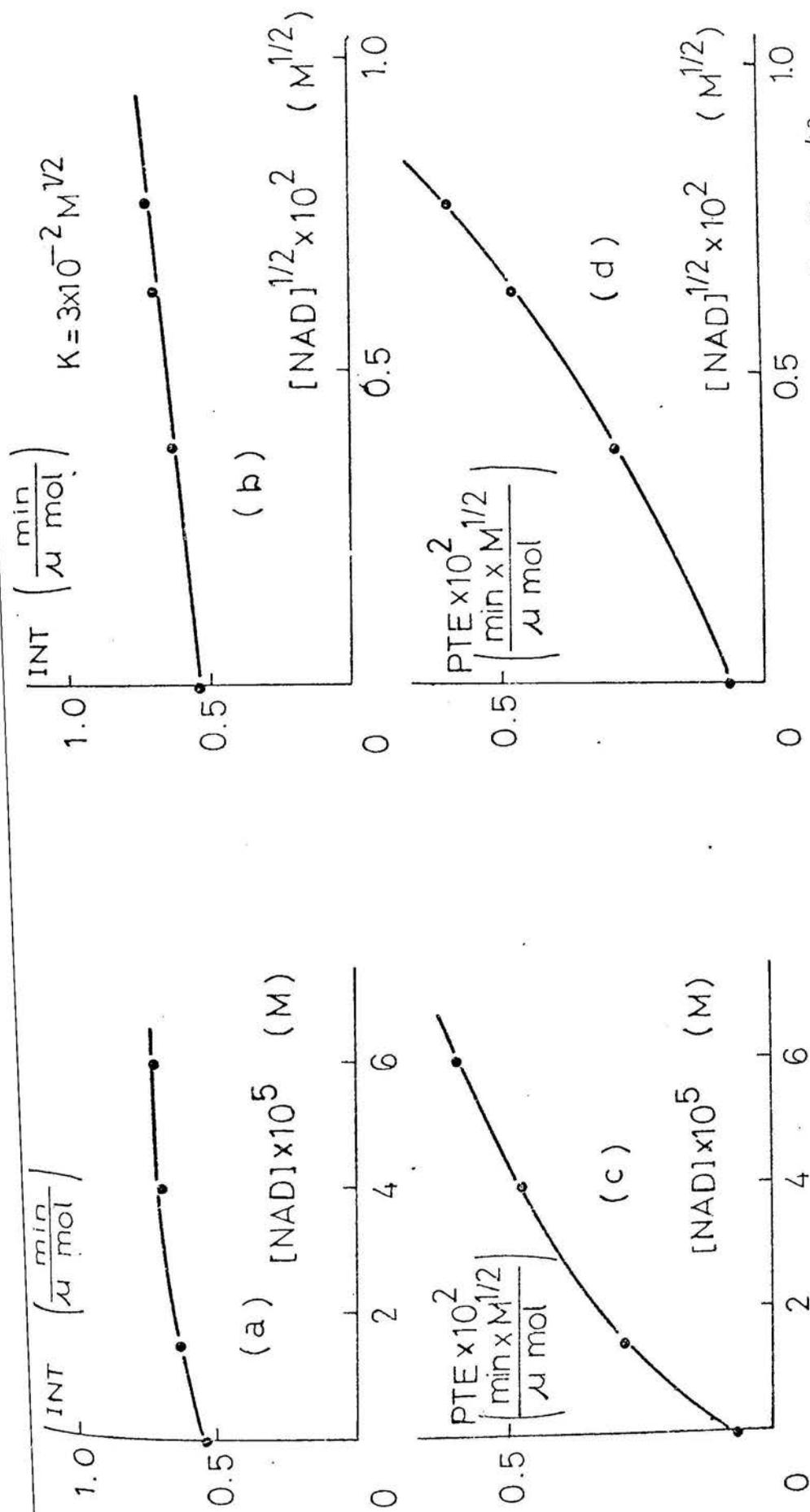


Fig. 51 Representación secundaria de intersecciones correspondientes a la fig. 49

(a) frente a $[\text{NAD}^+]^{1/2}$

(b) frente a $[\text{NAD}^+]^{1/2}$

(c) frente a $[\text{NAD}^+]^{1/2}$

(d) frente a $[\text{NAD}^+]^{1/2}$

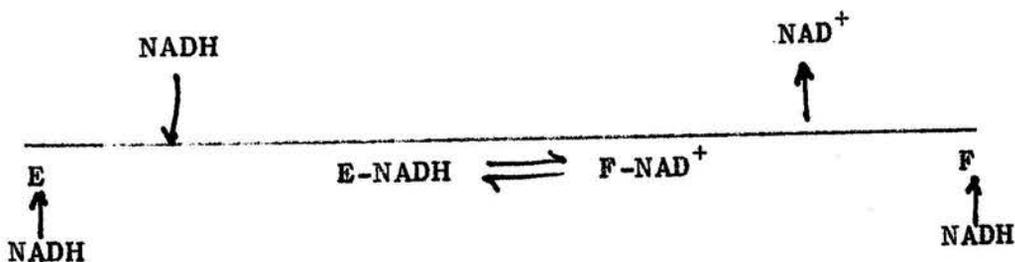
4.6.3

INHIBICION POR EXCESO DE SUSTRATO NADH

La actividad diaforásica de la XDH es inhibida por exceso de sustrato y se pone de manifiesto cuando las concentraciones de NADH son superiores a 1×10^{-4} M. La representación de Haldane-Murray para concentraciones de sustrato que producen la inhibición no se adapta a la linealidad, así como tampoco se adaptan las correspondientes de $1/v$ frente a la concentración de NADH elevada a $1/2$, 2 ó 3 .

No ha sido posible determinar el tipo de inhibición que produce el exceso de NADH por las desviaciones de la linealidad observadas en todos los casos. Si la representación de Haldane-Murray no es lineal, se debe aceptar que el NADH se fija a más de una forma enzimática distinta.

Como aproximación según la nomenclatura de Cleland, se podría postular que:



No es posible deducir de que forma afecta la concentración de NADH a la ecuación general de velocidad, pero puesto que el NADH es el propio sustrato o inhibe, se encuentra en la concentración saturante, lo cual introduce un paso irreversible en la secuencia de reacción, la inhibición no puede afectar a la pendiente sino únicamente a la intersección. La ecuación de $1/v$ quedará de la forma

$$\begin{aligned}
 1/v = & a(1 + c[\text{NAD}^+]^{1/2}) f. [\text{NADH}] + \\
 & + \frac{b}{[\text{NADH}]^{1/2}} (1 + m[\text{NAD}^+]^{1/2} + p[\text{NAD}^+])
 \end{aligned}$$

4.6.4

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

El suponer que el exponente que afecta a la concentración de NADH en la ecuación de $1/v$ es $1/2$, implica el aceptar que por cada centro activo del enzima, sólo se une medio mol de sustrato. Puesto que la XDH posee dos centros activos por molécula, no cabe suponer que cada centro activo acepte media molécula de sustrato. También es incorrecto aceptar que únicamente la mitad del enzima presente actúe si el sustrato se halla en exceso.

Aceptando la existencia de dos centros activos, se puede admitir la hipótesis de que la fijación del sustrato ocurra al azar, sobre cualquiera de los dos centros. Este hecho, junto con el valor de $1/2$ que afecta como exponente a la concentración de NADH, induce a pensar en la posibilidad de que por cada dos centros activos, sólo se añada una molécula de sustrato. La suposición está de acuerdo con el postulado de que el enzima está constituido por dos subunidades análogas, si bien, debe existir un mecanismo de control, mediante el cual, la introducción de una molécula de sustrato en una subunidad dificulta la entrada de la segunda molécula de sustrato en la otra subunidad,

Considerando la correspondiente ecuación de equilibrio, se debe asumir que ésta se refiere a un único centro activo ; así pues por mol de enzima (2E):



y referido a un solo centro activo:



4.6.5

DEDUCCION DE LA ECUACION DE VELOCIDAD

De acuerdo con las hipótesis formuladas y con los resultados experimentales obtenidos, se puede deducir la ecuación de velocidad por el método de King y Altman (106) (107), correspondiente al esquema de la fig. 52.

La ecuación de velocidad que se obtiene es la siguiente:

$$v = \frac{v_{\text{máx}} A^{1/2} B^{1/2}}{\text{denominador}}$$

siendo el valor del denominador:

$$\begin{aligned} & (K_B P^{1/2} / K_C + K_B K_H P / K_C) + K_B (1 + K_D P^{1/2} + K_E P) A^{1/2} + \\ & + K_A (1 + K_H P^{1/2}) B^{1/2} + (1 + K_A K_H K_J P^{1/2}) A^{1/2} B^{1/2} + \\ & + K_B (K_F P^{1/2} + K_K) A + K_G A B^{1/2} + K_B K_L K_A^{3/2} \end{aligned}$$

El valor de las constantes se detalla en la tabla XX.

A partir de esta ecuación de velocidad ordenando la expresión de 1/v en función de las distintas potencias de A :

$$\begin{aligned} 1/v = & \frac{1}{v_{\text{máx}}} \left[\left(1 + \frac{K_B}{B^{1/2}} \right) + \left(K_A K_H K_J + \frac{K_B K_D}{B^{1/2}} \right) P^{1/2} + \frac{K_E K_B}{B^{1/2}} P \right] + \\ & + \frac{1}{v_{\text{máx}}} \left[K_A + \left(K_A K_H + \frac{K_B}{K_C B^{1/2}} \right) P^{1/2} + \frac{K_B K_H}{K_C B^{1/2}} P \right] \frac{1}{A^{1/2}} + \\ & + \frac{1}{v_{\text{máx}}} \left[\left(K_G + \frac{K_B K_K}{B^{1/2}} \right) + \left(\frac{K_B K_F}{B^{1/2}} \right) P^{1/2} \right] A^{1/2} + \frac{1}{v_{\text{máx}}} \left(\frac{K_B K_L K_A}{B^{1/2}} \right) A \end{aligned}$$

T A B L A XX

SIGNIFICADO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS

DE LA ECUACION DE VELOCIDAD DE LA REACCION DIAFORASICA

$$V_{\text{máx}} = \frac{K_{11} K_3 k_5 k_9 E_t}{K_V} ;$$

$$K_V = k_5 k_9 k_{11} + k_4 k_9 k_{11} + k_3 k_9 k_{11} + k_3 k_5 k_{11} + k_3 k_5 k_{10} + k_3 k_5 k_9 ;$$

$$K_B = \frac{(k_9 k_{11} + k_8 k_{11} + k_8 k_{10}) k_3 k_5}{K_V k_7} ; \quad K_E = \frac{K_H K_J}{K_C} ;$$

$$K_C = \frac{k_1 k_3 k_5}{k_2 k_4 k_6} ; \quad K_A = \frac{(k_3 k_5 + k_2 k_5 + k_2 k_4) k_9 k_{11}}{k_1 K_V} ;$$

$$K_D = \frac{(k_3 + k_4) k_6}{k_3 k_5} ; \quad K_F = \frac{k_{13} k_6 k_4}{k_5 k_3 k_{14}} + \frac{K_{15} k_6}{k_5 k_{16}} ;$$

$$K_G = \frac{k_9 k_{11}}{K_V} \left(K_5 \frac{k_{13}}{k_{14}} + k_4 \frac{k_{13}}{K_{14}} + k_3 \frac{k_{15}}{k_{16}} \right) +$$

$$\dagger \frac{k_3 k_5}{K_V} \left(k_{11} \frac{k_{21}}{k_{22}} + k_{10} \frac{k_{21}}{k_{22}} + k_9 \frac{k_{23}}{k_{24}} \right) ;$$

$$K_{G'} = \frac{k_9 k_{11}}{K_V} \left(k_5 \frac{k_{13}}{k_{14}} + k_4 \frac{k_{13}}{k_{14}} + k_3 \frac{k_{15}}{k_{16}} \right) ;$$

$$K_H = \frac{k_{25}}{k_{26}} ; \quad K_K = \frac{k_{17}}{k_{18}} ; \quad K_J = \frac{k_{27}}{k_{28}} ; \quad K_L = \frac{k_{19}}{k_{20}}$$

En ausencia del producto P, la ecuación se convierte en :

$$1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(1 + \frac{K_B}{B^{1/2}} \right) + \frac{K_A}{V_{\text{máx}}} \frac{1}{A^{1/2}} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(K_G + \frac{K_B K_K}{B^{1/2}} \right) A^{1/2} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \frac{K_B K_K K_L}{B^{1/2}} A$$

Como se puede apreciar, la representación de $1/v$ frente a $1/A^{1/2}$ ha de ser lineal para concentraciones bajas de A. Puede observarse, que en ausencia de exceso de sustrato los términos $A^{1/2}$ y A se hacen despreciables y entonces la pendiente de la recta $K_A/V_{\text{máx}}$ no depende del segundo sustrato, que es B, lo cual es característico de un mecanismo "ping-pong".

Asimismo, la representación de Haldane-Murray, no debe ser lineal, ni tampoco debe serlo la de $1/v$ frente a $A^{1/2}$, lo cual está de acuerdo con los resultados experimentales, siempre y cuando ambos sumandos posean un valor equivalente.

Efectuando un análisis detallado de la expresión, se observa que la representación de $1/v$ frente a $1/A^{1/2}$ debe ser lineal lo cual está de acuerdo con los resultados experimentales, ya que para concentraciones de A inferiores a la saturante los términos conteniendo A y $A^{1/2}$ carecen de significación. De la misma forma, las representaciones secundarias de las intersecciones y de las pendientes frente a $P^{1/2}$ corresponden a parábolas cóncavas según la ecuación teórica.

En el caso de las pendientes los resultados experimentales son concordantes con los previstos teóricamente. Cuando se trata de las intersecciones, resulta más difícil apreciar si la representación es lineal o bien parabólica debido a la proximidad de los valores en las representaciones gráficas. Para que se obtuviesen representaciones lineales frente a $P^{1/2}$ bastaría que el factor que afecta a P en la intersección, $K_E K_B / B^{1/2}$,

se anulase, pero el único factor que puede ser igual a cero es K_E y dentro de K_E pueden serlo K_H (k_{25}), o bien K_J (k_{27}). No se puede pensar que K_H se anule, ya que si fuese así la representación secundaria de las pendientes frente a $P^{1/2}$ debería ser lineal, con lo cual se apartaría de los resultados experimentales. Por tanto, si K_H es distinto de cero, K_J deberá ser el que sea igual a cero, lo que corresponde a los resultados experimentales.

Se podría, aceptar la no existencia del complejo $E-NAD^{+}_{1/2}$ $NADH_{1/2}$, debiendo ser en este caso lineal la representación de las intersecciones frente a $P^{1/2}$, lo cual puede ser posible de acuerdo con los resultados experimentales.

La inexistencia de k_{13} afecta a K_F y a K_G , pero de ningún modo provoca que éstas desaparezcan, con lo cual no se modifica sustancialmente la ecuación de velocidad. Análogo razonamiento se puede efectuar para la no existencia de K_{15} .

Si se anulan ambas constantes, k_{13} y k_{15} , se anula también K_F , con lo que el factor que afecta a $A^{1/2}$ se hace independiente de P , lo cual implica que al representar $1/v$ frente a $A^{1/2}$, en la inhibición por exceso de sustrato, las curvas obtenidas para distintas concentraciones de P no sean convergentes.

Si K_L (k_{19}) no existe, implica la desaparición del factor que afecta a A en la ecuación de $1/v$ con lo que la representación de $1/v$ frente a $A^{1/2}$ debe ser lineal, cosa que no se observa en las representaciones efectuadas a partir de los resultados experimentales; así pues, K_L debesser distinto de cero y debe existir el complejo $F-NADH$. Un hecho análogo ocurre si no existe K_K (k_{17}). De aquí se deduce que K_K y K_L deben tener un valor distinto de cero.

La existencia de k_{21} y k_{23} afecta solamente a K_G , pero aunque ambas sean nulas no se anula ésta, sino que únicamente se anu-

la su valor. Así pues, no es posible demostrar la existencia de los complejos $F-O-NADH_{1/2}$ y $E-(H_2O_2)_{1/2}-NADH_{1/2}$.

Si se eliminan todos aquellos complejos cuya ausencia no modifica fundamentalmente la expresión de $1/v$, (esto es, los que en la fig. 52 corresponden a $E-P_{1/2}-A_{1/2}$, $E-Q_{1/2}-A_{1/2}$ y $F-B_{1/2}-A_{1/2}$) queda un esquema mecanístico de estructura mucho más sencilla, cuya ecuación general es:

$$\begin{aligned}
 1/v = & \frac{1}{v_{\text{máx}}} \left[\left(1 + \frac{K_B}{B^{1/2}} \right) + \frac{K_B K_D}{B^{1/2}} P^{1/2} \right] + \\
 & + \frac{1}{v_{\text{máx}}} \left[K_A + \left(K_A K_H + \frac{K_B}{K_C B^{1/2}} \right) P^{1/2} + \frac{K_B K_H}{K_C B^{1/2}} P \right] \frac{1}{A^{1/2}} + \\
 & + \frac{1}{v_{\text{máx}}} \left[K'_G + \frac{K_B K_K}{B^{1/2}} + \frac{K_B K_F}{B^{1/2}} P^{1/2} \right] A^{1/2} + \\
 & + \frac{1}{v_{\text{máx}}} \frac{K_B K_K K_L}{B^{1/2}} A
 \end{aligned}$$

4.6.6 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA XDH EN EL SISTEMA XANTINA-O₂-XDH-AC.URICO-H₂O₂

La XDH es una deshidrogenasa típica, que también es capaz de actuar como oxidasa utilizando al oxígeno como aceptor electrónico en la oxidación de la xantina a ácido úrico.

En el estudio de esta reacción, se comenzó estudiando la variación de la velocidad de reacción con distintas concentraciones de sustrato xantina. La concentración más elevada de xantina utilizada fue $2,5 \times 10^{-4}$ M.

Al efectuar la representación de Lineweaver-Burck, apareció una representación no lineal (fig. 53 a). Se observa en ella un aumento anormal de la velocidad al aumentar la concentración del sustrato xantina. En el margen de concentraciones con el que se experimenta, no apareció el fenómeno de inhibición por exceso de sustrato. En una representación no lineal resulta de gran dificultad el cálculo de los parámetros cinéticos, y sólo se puede efectuar una determinación aproximada de la velocidad máxi-ma.

Se efectuaron las representaciones de Lineweaver-Burck a pH 7,4 y 8,0, con el fin de interpretar las divergencias de li-nealidad. Si se admite la hipótesis de la existencia de dos himimoléculas en la XDH, cada una de las cuales posee un solo centro activo, la ecuación de velocidad que le corresponderá suponiendo que tengan distintas afinidad para el sustrato será:

$$y = \frac{ax^2 + bx + c}{cx + d}$$

que corresponde a la ecuación de una hipérbola, en la cual $y = 1/v$ y $x = 1/[xantina]$; a, b, c y d representan relaciones entre los distintos parámetros cinéticos.

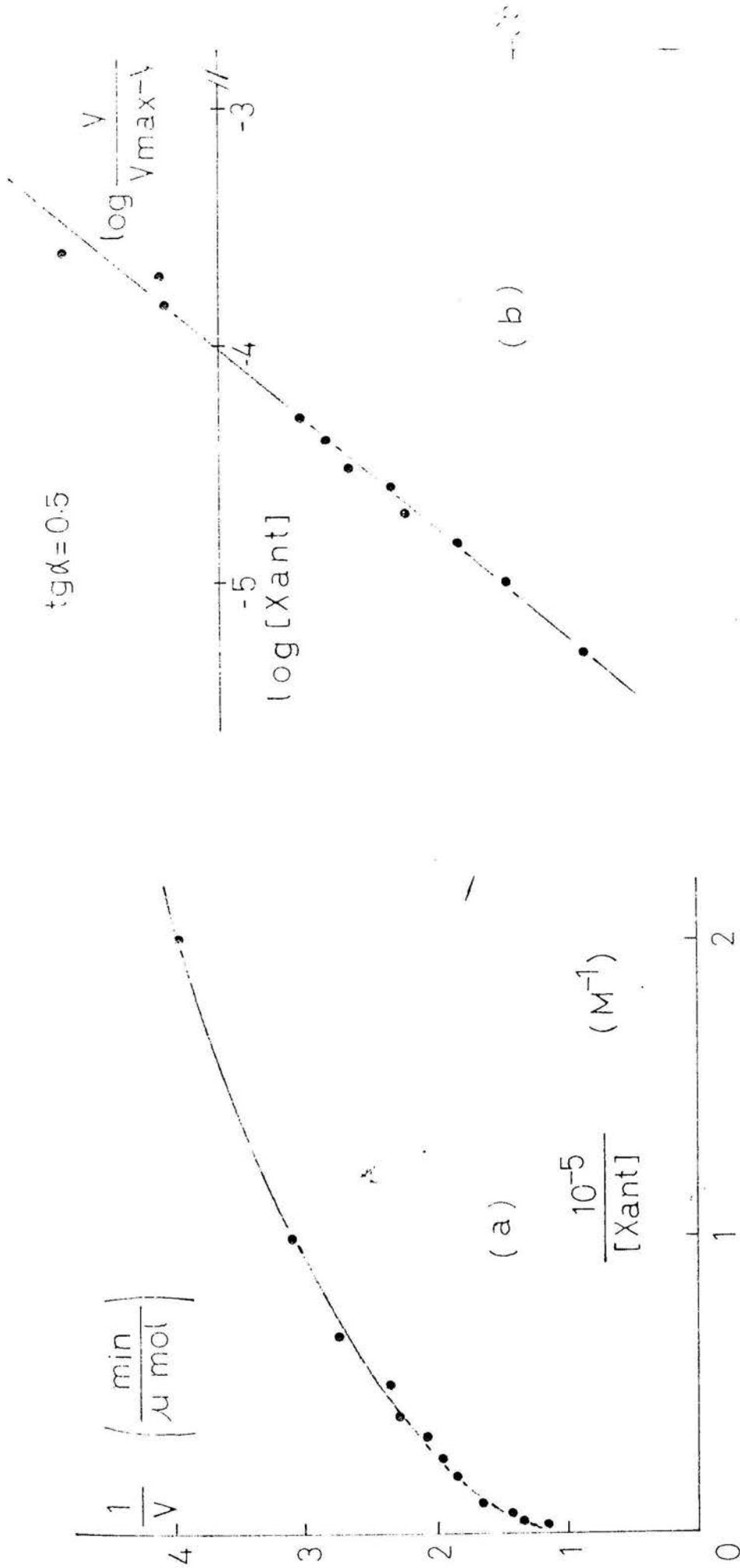


Fig. 53 (a) Representación de Lineweaver-Burck (Sa XANTINA-O₂-XDH-AC. URICO-H₂O₂)
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0 ; [XDH] = 32 U/ml
 (b) Representación de Hill correspondiente a la fig. 53 a

Para hallar el valor de a, b, c y d se ajustaron las curvas obtenidas por el método de los mínimos cuadrados. Una vez hallados los valores de los citados parámetros, se calcularon los valores teóricos de y (1/v), obtenidos de acuerdo con la ecuación una vez conocidos los valores de las distintas constantes. Este proceso resultó de interés para analizar la desviación entre los distintos valores de y, obtenidos teóricamente y experimentalmente. Al efectuar las representaciones de Line-weaver-Burck para ambos valores (fig. 54 a), se observa que para concentraciones bajas de xantina apenas existen desviaciones y éstas se encuentran compensadas. Sin embargo, al aumentar las concentraciones de xantina, se aprecia que los valores experimentales obtenidos no se adaptan a la ecuación teórica ya que para valores bajos de x, los valores teóricos de y son mayores que los experimentales.

Por otra parte, una representación como la de la fig. 53 a, podría corresponder a la ecuación de una parábola, cuyo eje fuera el de abscisas o uno paralelo a éste. Una parábola de este tipo obedece a una ecuación tal como:

$$ay^2 + by + c = x$$

en la cual $y=1/v$ y $x=1/[xantina]$; a, b y c corresponden a distintas combinaciones entre los distintos parámetros cinéticos. Igualmente esta curva se ajustó mediante el método de los mínimos cuadrados para obtener los valores de a, b y c y una vez hallados, se calcularon los valores teóricos de y por medio de la ecuación postulada teóricamente. Al representar los valores experimentales y los teóricos de y, frente a $1/[xantina]$ y superponer ambas gráficas, se observa que prácticamente no existe desviación alguna tanto para las concentraciones altas de sustrato como para las bajas (fig. 54 b). Asimismo, se pone de manifiesto que para esta parábola sólo existe un punto de corte con el eje de ordenadas y es a su vez tangente a dicho eje, lo cual está de acuerdo con los valores próximos a cero obtenidos para el discriminante, (b^2-4ac) . Al despejar y de la ecuación de

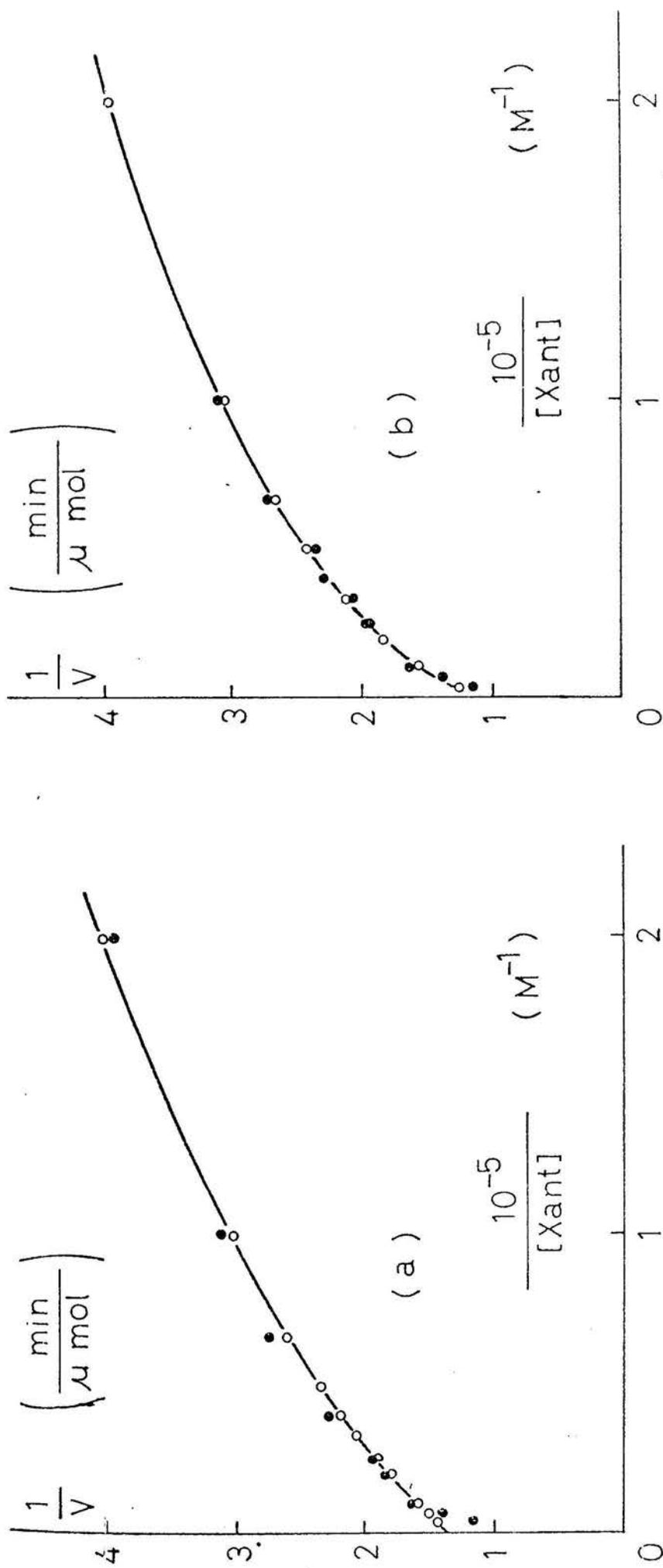


Fig. 54 Representación de Lineweaver-Burck correspondiente a la fig. 53 a

(a) ajustados teóricamente a la ecuación de una hipérbola

(b) ajustados teóricamente a la ecuación de una parábola

(○) valores experimentales ; (●) valores teóricos

la parábola, y tomando como cero el valor del discriminante, se obtiene:

$$y = \frac{-b}{2a} \pm \frac{a}{a} x^{1/2}$$

Se observa en esta ecuación que la representación de $1/v$ frente a $1/x$ tiene $1/2$ ha de dar lugar a la aparición de una línea recta.

Por otra parte, las representaciones de Hill construídas al considerar como velocidad máxima la que resulta de hallar el punto de intersección de la curva de la fig. 53 a con el eje de ordenadas, da como resultados rectas de pendiente 0,5 (fig. 53 b).

Este hecho, junto con el citado anteriormente, justifica el utilizar la representación de $1/v$ frente a $1/[xantina]^{1/2}$, la cual da lugar a la aparición de líneas rectas (fig. 55 a). Estas representaciones permiten la obtención de los parámetros cinéticos. Análogamente las representaciones de Hill efectuadas a partir de la velocidad máxima obtenida en la fig. 55 a, da lugar a la aparición de pendiente 0,5 (fig. 55 b), lo cual parece confirmar que en la ecuación de velocidad para esta reacción el exponente que afecta a la concentración de sustrato es 0,5.

4.6.7 INHIBICION POR ACIDO URICO DE LA XDH EN EL SISTEMA XANTINA-O₂-XDH-AC. URICO-H₂O₂

La siguiente etapa para determinar la forma de actuación de la XDH sobre la xantina en el sistema en estudio, fué la determinación del efecto que las concentraciones crecientes de ácido úrico ejercen sobre la actividad catalítica del enzima.

Trabajando con concentraciones de xantina análogas a las utilizadas en el apartado anterior y distintas concentraciones de

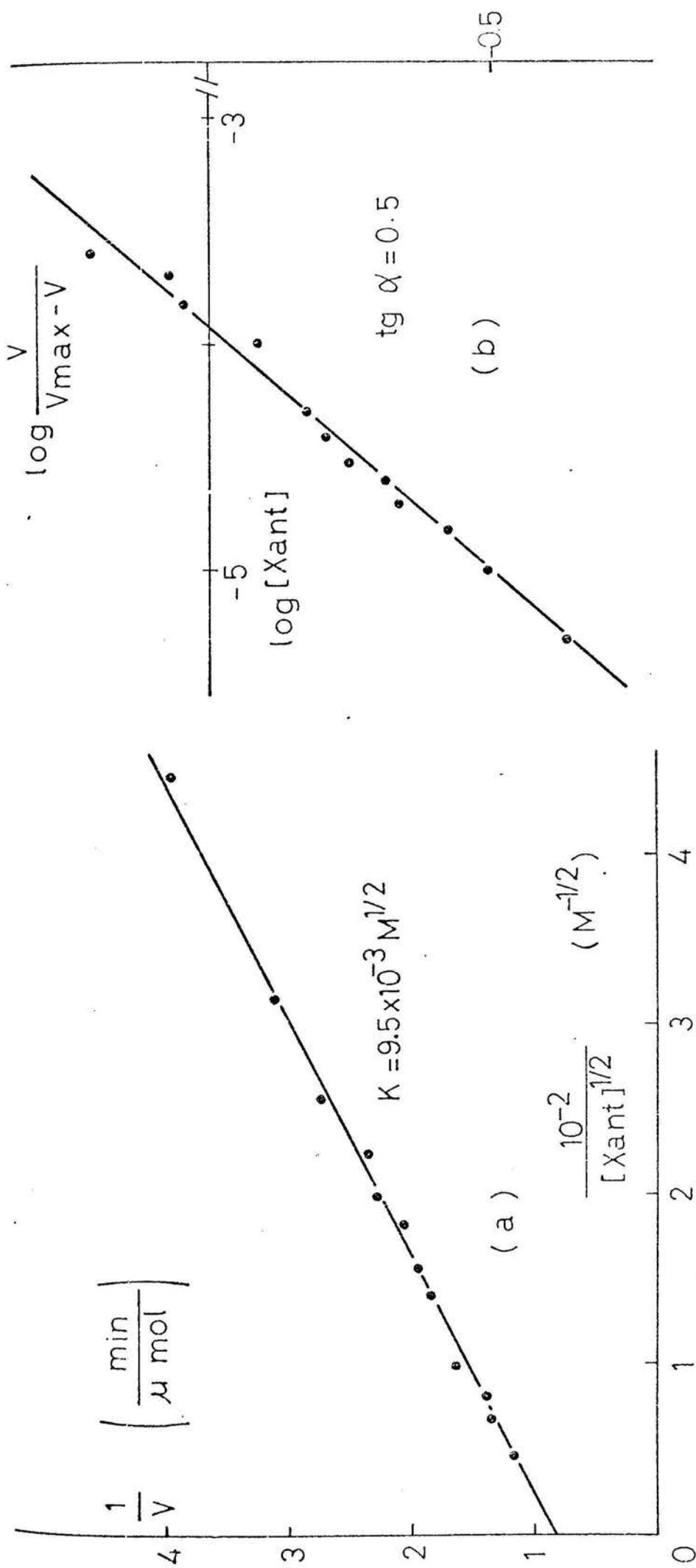


Fig. 55 (a) Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{xantina}]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 53 a
 (b) Representación de Hill correspondiente a la fig. 55 a

ácido úrico, se obtuvieron distintos valores de velocidad. En la representación de Lineweaver-Burck aparecen distintas curvas para las diferentes concentraciones del producto de la reacción (fig. 56 a).

Al prolongar las parábolas aparentes, se obtienen las velocidades máximas aparentes, que utilizadas para efectuar la representación de Hill, conducen a la obtención de rectas cuya pendiente es 0,5.

De acuerdo con estos resultados se utilizó de nuevo la representación de $1/v$ frente a $1/[Xantina]^{1/2}$ y aparecen de nuevo líneas rectas (fig. 56 b). Los valores de velocidad máxima hallados a partir de esta representación conducen mediante la representación de Hill a rectas de pendiente 0,5. De la representación de la fig. 56 b se puede deducir que el ácido úrico como inhibidor afecta a la pendiente y a la intersección de la citada representación. Al efectuar la representación secundaria de las intersecciones frente a la concentración de ácido úrico, se obtiene una línea recta (fig. 57 a); si bien, el hecho no es muy significativo dada la proximidad de los valores de las intersecciones para las distintas concentraciones de ácido úrico. La representación secundaria de las pendientes de la fig. 56 b frente a $[ac. \text{úrico}]^{1/2}$, $[ac. \text{úrico}]$ y $[ac. \text{úrico}]^{3/2}$, es de la forma indicada en las figs. 57 b, 57 c y 57 d, lo cual es indicio de que en la ecuación de $1/v$ el factor que afecta a la pendiente contiene términos que dependen de la concentración de ácido úrico que se halla afectada como mínimo de un exponente superior a la unidad.

4.6.8 DEDUCCION DE LA ECUACION DE VELOCIDAD PARA LA XDH EN EL SISTEMA XANTINA-O₂-XDH-AC.URICO-H₂O₂

Al considerar únicamente la inhibición por ácido úrico y aceptar la limitación de los resultados experimentales se puede llegar a una ecuación de velocidad de la forma:

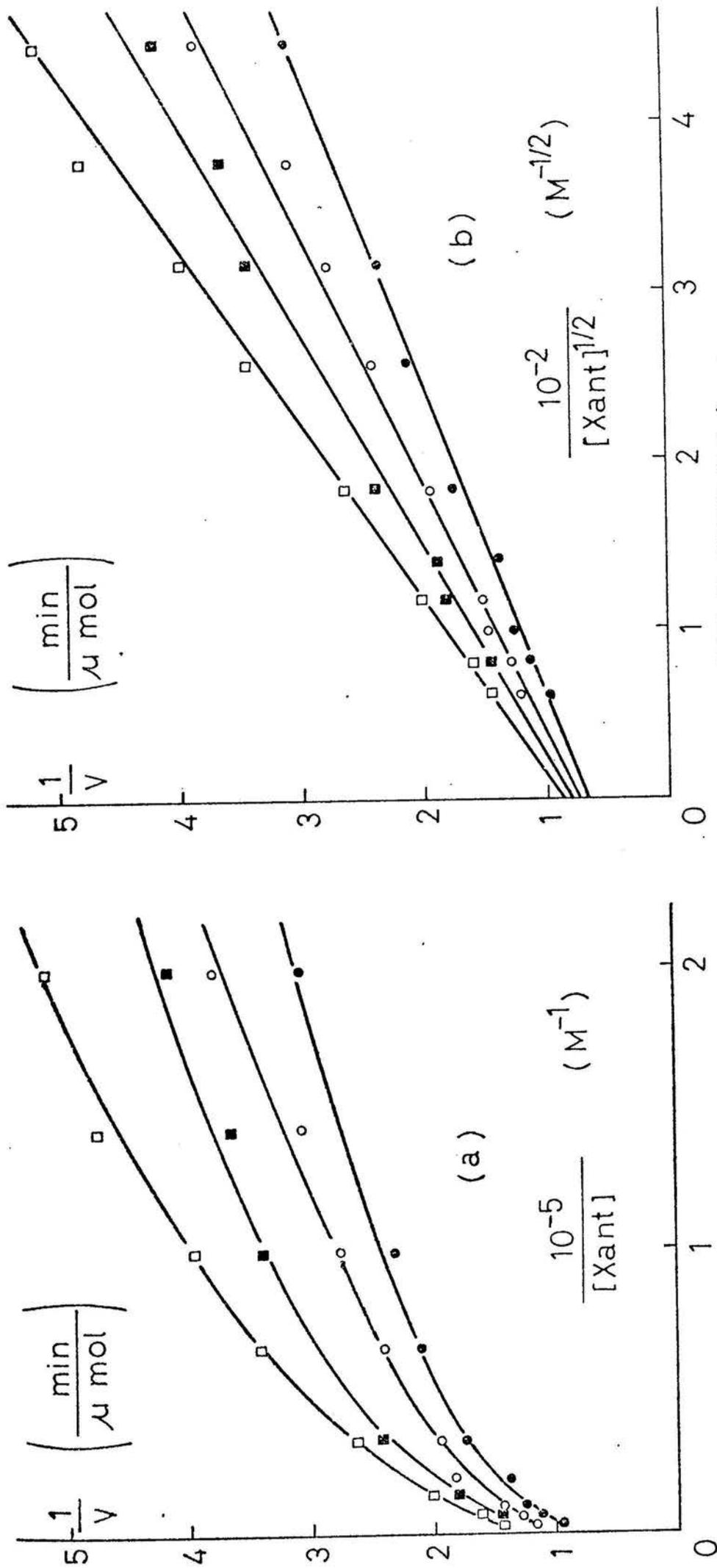


Fig. 56 Inhibición de la XDH por ácido úrico (Se XANTINA-O₂-XDH-AC. URICO-H₂O₂)

Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0 ; [XDH] = 32 U/ml

De arriba a abajo: [ác. úrico] × 10⁵ M⁻¹ = 0; 3; 5; 7

(a) Representación de Lineweaver-Burck ; (b) Representación de 1/v frente a 1/[xantina]^{1/2}

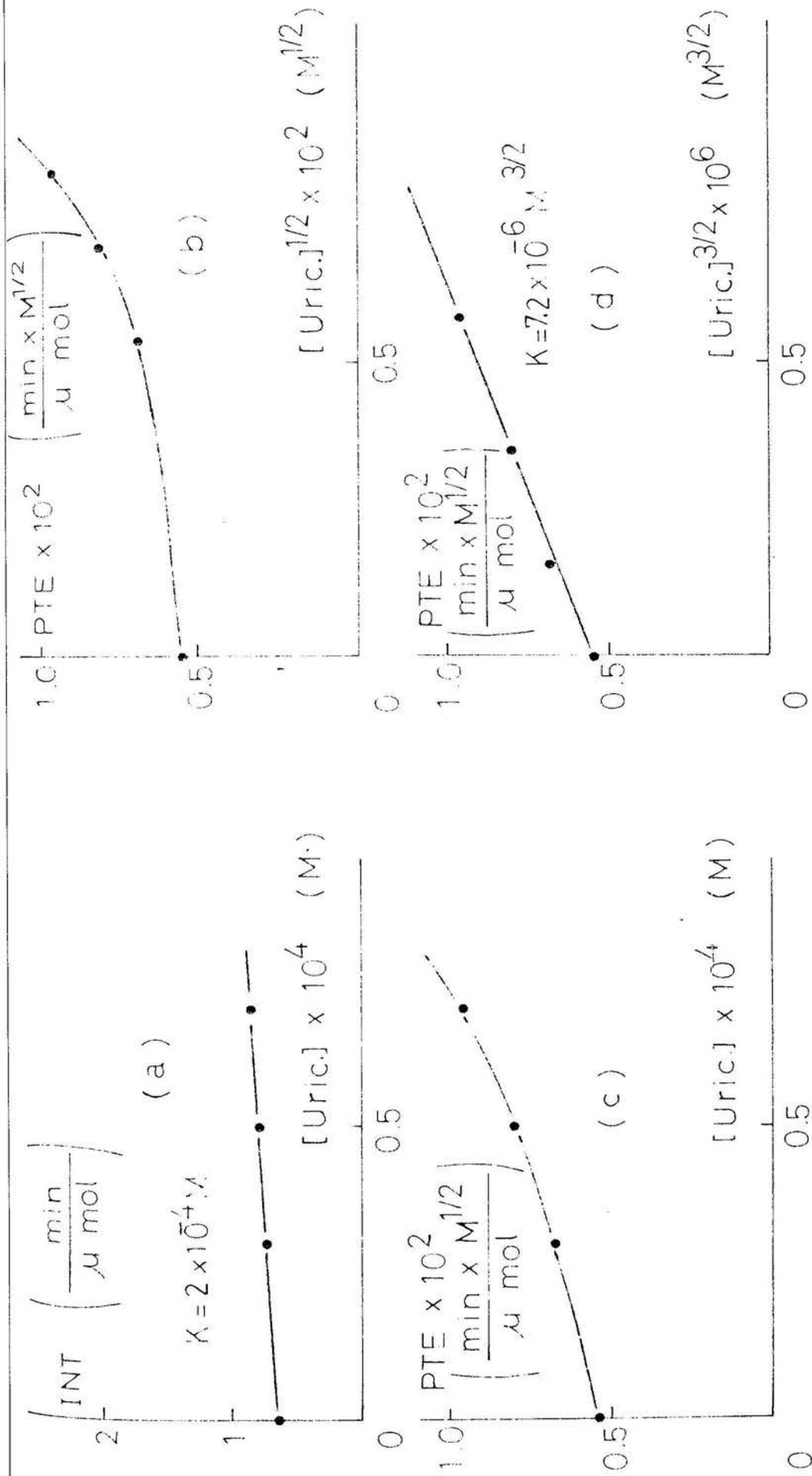


Fig. 57 Representaciones secundarias correspondientes a la fig. 57 a

(a) de intersecciones frente a $[\text{ác.úrico}]$; (b) de pendientes frente a $[\text{ác.úrico}]^{1/2}$
 (c) de pendientes frente a $[\text{ác.úrico}]$; (d) de pendientes frente a $[\text{ác.úrico}]^{3/2}$

$$1/v = a (1 + f'(\text{úrico})) + \frac{b}{[\text{xantina}]^{1/2}} (1 + f''(\text{úrico}))$$

Por analogía con la reacción diaforásica, se podría pensar en un esquema tal como el de la fig. 58, y deducir la ecuación de velocidad por el método de King y Altman (106) (107). De acuerdo con esto se llega a una ecuación tal como:

$$v = \frac{V_{\text{máx}} A^{1/2} B^{1/2}}{\text{denominador}}$$

siendo el valor del denominador:

$$\begin{aligned} & K_C K_B A^{1/2} + K_H K_C B^{1/2} + K_J K_B P^{1/2} + K_J K_N K_B P + K_J K_N K_O K_B P^{3/2} + \\ & A^{1/2} B^{1/2} + K_K K_D A^{1/2} P^{1/2} + K_K K_E A^{1/2} P + K_H K_N K_C B^{1/2} P^{1/2} + \\ & K_L K_F A^{1/2} B^{1/2} P^{1/2} + K_H K_N K_O K_C B^{1/2} P \end{aligned}$$

en el cual las constantes poseen el significado que se detalla en la tabla XXI.

A partir de la ecuación de velocidad se deduce la siguiente expresión de 1/v :

$$\begin{aligned} 1/v = & \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left[\left(1 + \frac{K_G K_B}{B^{1/2}} \right) + \left(\frac{K_K K_D}{B^{1/2}} + K_L K_F \right) P^{1/2} + \frac{K_E K_K}{B^{1/2}} P \right] + \\ & + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left[K_H K_C + \left(\frac{K_J K_B}{B^{1/2}} + K_H K_N K_C \right) P^{1/2} + \right. \\ & \left. + \left(\frac{K_H K_N K_O K_C}{B^{1/2}} + \frac{K_J K_N K_B}{B^{1/2}} \right) P + \frac{K_J K_N K_O K_B}{B^{1/2}} P^{3/2} \right] \frac{1}{A^{1/2}} \end{aligned}$$

de la cual se deduce que la representación de $1/A^{1/2}$ ($1/[\text{xantina}]^{1/2}$) debe ser lineal lo cual está de acuerdo con los resultados experimentales.

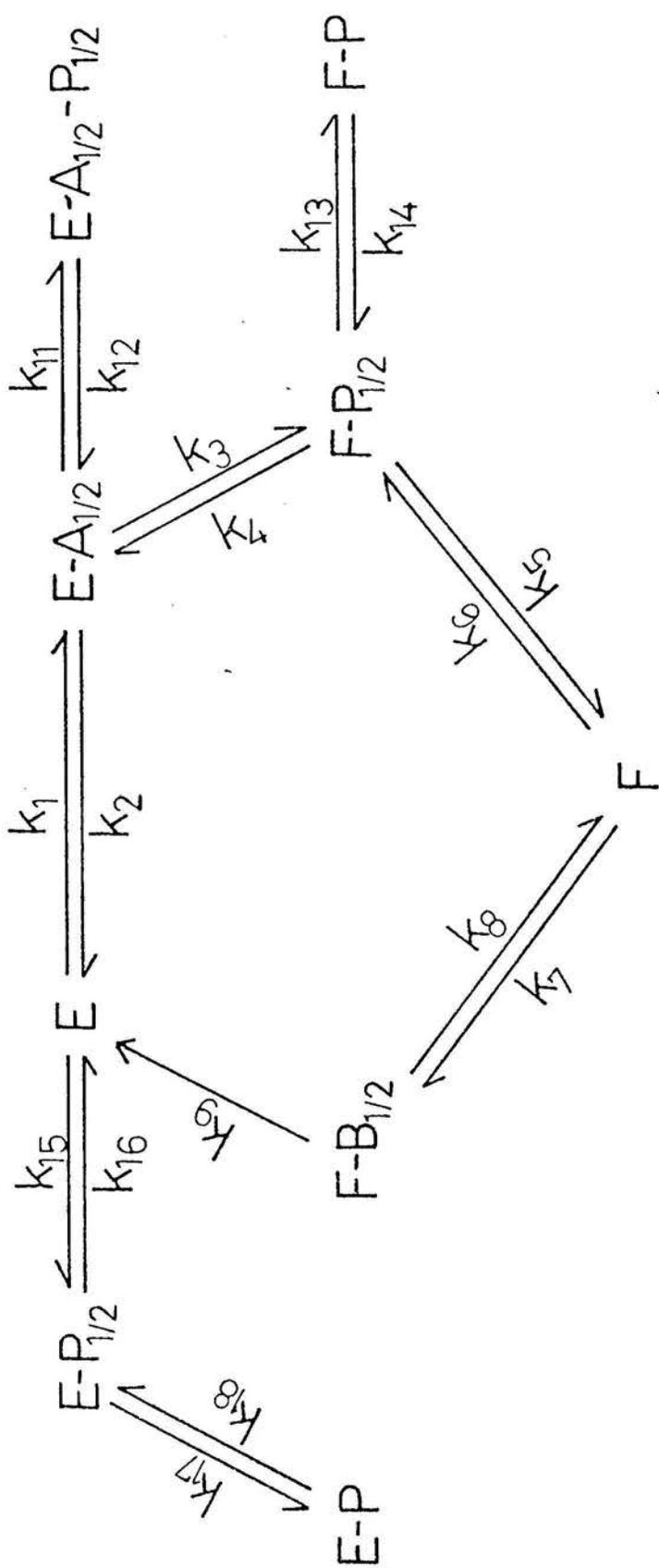


Fig. 58 Mecanismo reaccional de la XDH (Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0)
 A= xantina ; B= O₂ ; P = ácido úrico ; E= XDH oxidada ; F= XDH reducida

T A B LA XXI

SIGNIFICADO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS EN LA ECUACION DE VELOCIDAD DE LA REACCION OXIDASICA

$$V_{\text{máx}} = \frac{k_3 k_5 k_9 E_t}{K_A} ; \quad K_A = k_4 k_9 + k_5 k_9 + k_3 k_9 + k_3 k_5 ;$$

$$K_B = \frac{k_4 k_9}{K_A} ; \quad K_C = \frac{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5}{K_A} ;$$

$$K_D = \frac{k_4 k_8 + k_4 k_9 + k_3 k_8 + k_3 k_9}{K_A} ;$$

$$K_E = \frac{k_4 k_8 k_{11}/k_{12} + k_4 k_9 k_{11}/k_{12} + k_3 k_8 k_{13}/k_{14} + k_3 k_9 k_{13}/k_{14}}{K_A} ;$$

$$K_F = \frac{k_4 k_{11}/k_{12} + k_5 k_{11}/k_{12} + k_3 k_{13}/k_{14}}{K_A} ; \quad K_G = \frac{k_3 k_5}{k_7} ;$$

$$K_H = \frac{k_9}{k_1} ; \quad K_J = \frac{k_4 k_6 k_2}{k_7 k_1} ; \quad K_K = \frac{k_6}{k_7} ; \quad K_L = k_8$$

$$K_N = \frac{k_{15}}{k_{16}} ; \quad K_O = \frac{k_{17}}{k_{13}}$$

De igual forma, la representación secundaria de las intersecciones y de las pendientes frente a $P^{1/2}$ ($[\bar{\text{ác.úrico}}]^{1/2}$), corresponde a una parábola cóncava y frente a P a una parábola convexa. Experimentalmente se ha podido observar que la representación de las intersecciones frente a P es lineal, lo cual se puede interpretar pensando que se anula el factor que anula a $P^{1/2}$; pero, no es así ya que, K_K y K_D no pueden anularse. Entonces, el hecho de que la representación de intersecciones frente a P (ác.úrico) sea lineal induce a pensar que es debido a que el factor que afecta a $P^{1/2}$ tiene poca importancia respecto al factor que afecta a P, o bien, que ambos tienen un valor muy pequeño lo que implica que los valores de las intersecciones dependan de forma mínima del producto P y tengan valores muy próximos.

Igualmente, de la ecuación deducida se puede observar que el factor que afecta a la pendiente incluye términos que dependen de P en grado muy diverso. En principio, esto parece estar de acuerdo con las representaciones de las figs. 57 b, 57 c, y 57 d. Así pues, se puede pensar en un mecanismo de reacción como el expuesto, siendo indiferente el que exista solamente k_{11} o k_{13} , o bien, ambos a la vez; puede formarse el complejo $E\text{-xantina}_{1/2}\text{-ác.úrico}_{1/2}$, o bien, el complejo E-ác.úrico o bien ambos a la vez.

4.6.9 DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA XDH EN EL SISTEMA XANTINA-NAD⁺-XDH-AC.URICO-NADH

La XDH es una enzima que cataliza principalmente la oxidación de la xantina utilizando el NAD⁺ como aceptor electrónico. Para completar el conocimiento cinético del enzima se procedió a efectuar la determinación de los parámetros cinéticos, determinándose, en primer lugar, la variación de la velocidad para distintas concentraciones de xantina y de NAD⁺. En ambos casos se calculó la concentración saturante que fué 2×10^{-4} M y $1,4 \times 10^{-3}$ M respectivamente.

Al efectuar la representación de Lineweaver-Burck correspondiente a la xantina se obtienen líneas rectas, las cuales se desvían ligeramente del paralelismo (fig. 59 a). La representación secundaria de las pendientes es lineal frente a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$ (fig. 63 b). De la representación secundaria de Vestling-Florini, al expresar los distintos valores de velocidad máxima obtenidos frente a las inversas de $[\text{NAD}^+]$ que los proporcionan, se obtuvo una representación no lineal que corresponde a una parábola convexa (fig. 59 b).

De la representación de Lineweaver-Burck correspondiente al NAD⁺, se obtienen representaciones no lineales, que también son parábolas convexas (fig. 60 a). En la representación de Vestling-Florini derivada de ésta, se obtiene una línea recta (fig. 60 b).

A partir de las velocidades máximas se construyeron las representaciones de Hill, obteniéndose una pendiente de 0,98 y de 0,56 para la xantina y el NAD⁺ respectivamente (fig. 61 a y 61 b).

Con estos resultados y teniendo en cuenta los estudios realizados para las otras reacciones, se consideró conveniente efectuar la representación de los valores de $1/v$ frente a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$, dando lugar a rectas no paralelas (fig. 62 a), la pendiente de las cuales representada frente a $1/[\text{xantina}]$ es lineal (fig. 63 c). La representación de Vestling-Florini de la fig. 59 b,

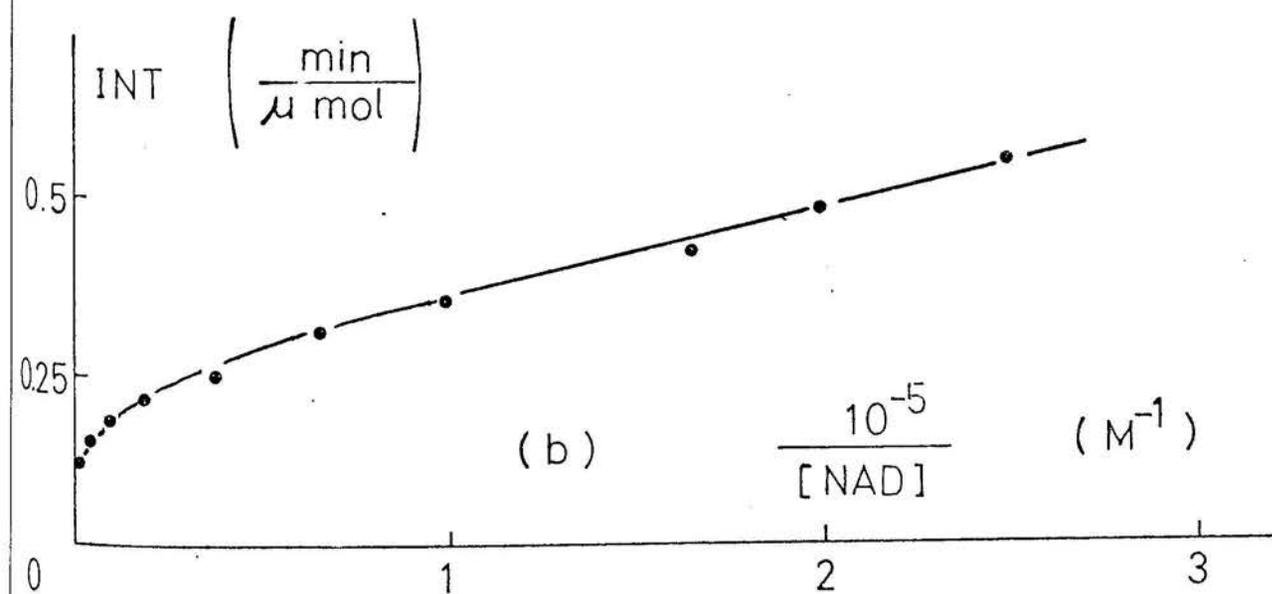
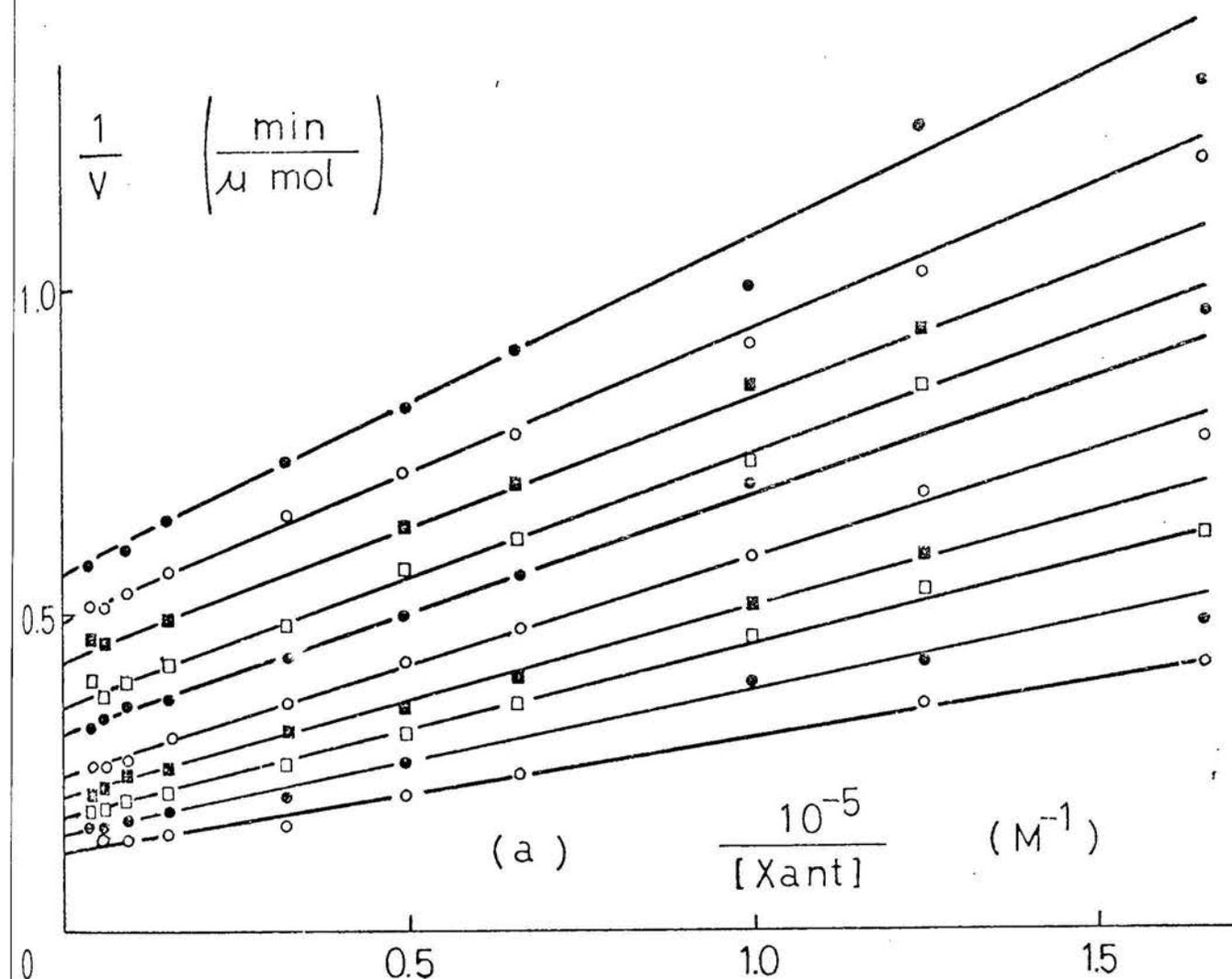


Fig. 59 Cálculo de los parámetros reales ($S_{\text{aXANTINA-NAD}^+ \text{-XDH-AC. URICO-NADH}$). Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0; $[\text{XDH}] = 16 \text{ U/ml}$. De abajo a arriba: $[\text{NAD}^+] \times 10^5 \text{ M}^{-1} = 50; 20; 10; 5; 2,5; 1,5; 1; 0,6; 0,5; 0,4$ (a) Representación de Lineweaver-Burck (b) Representación secundaria de Vestling-Florini

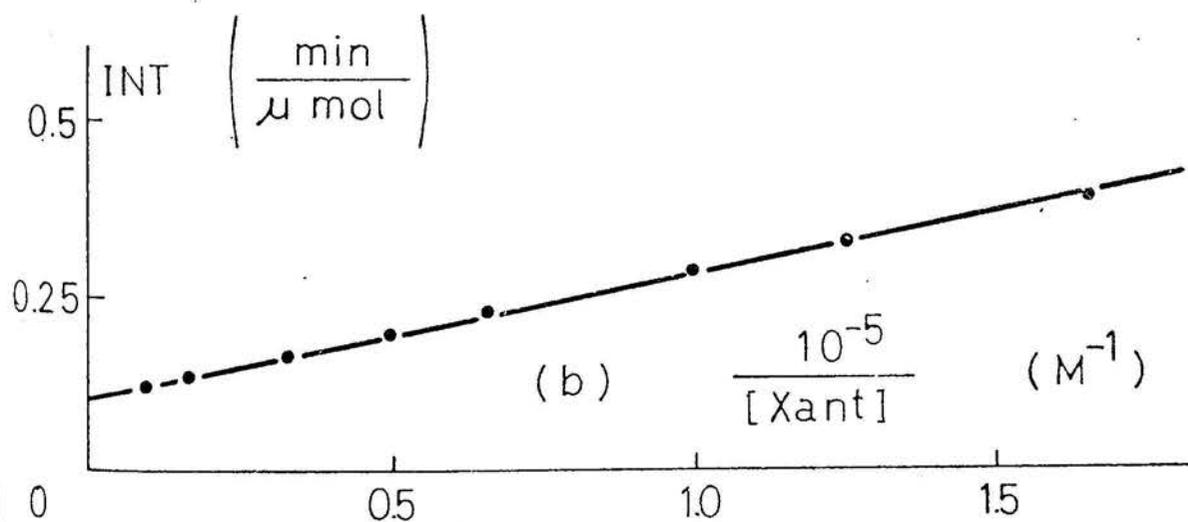
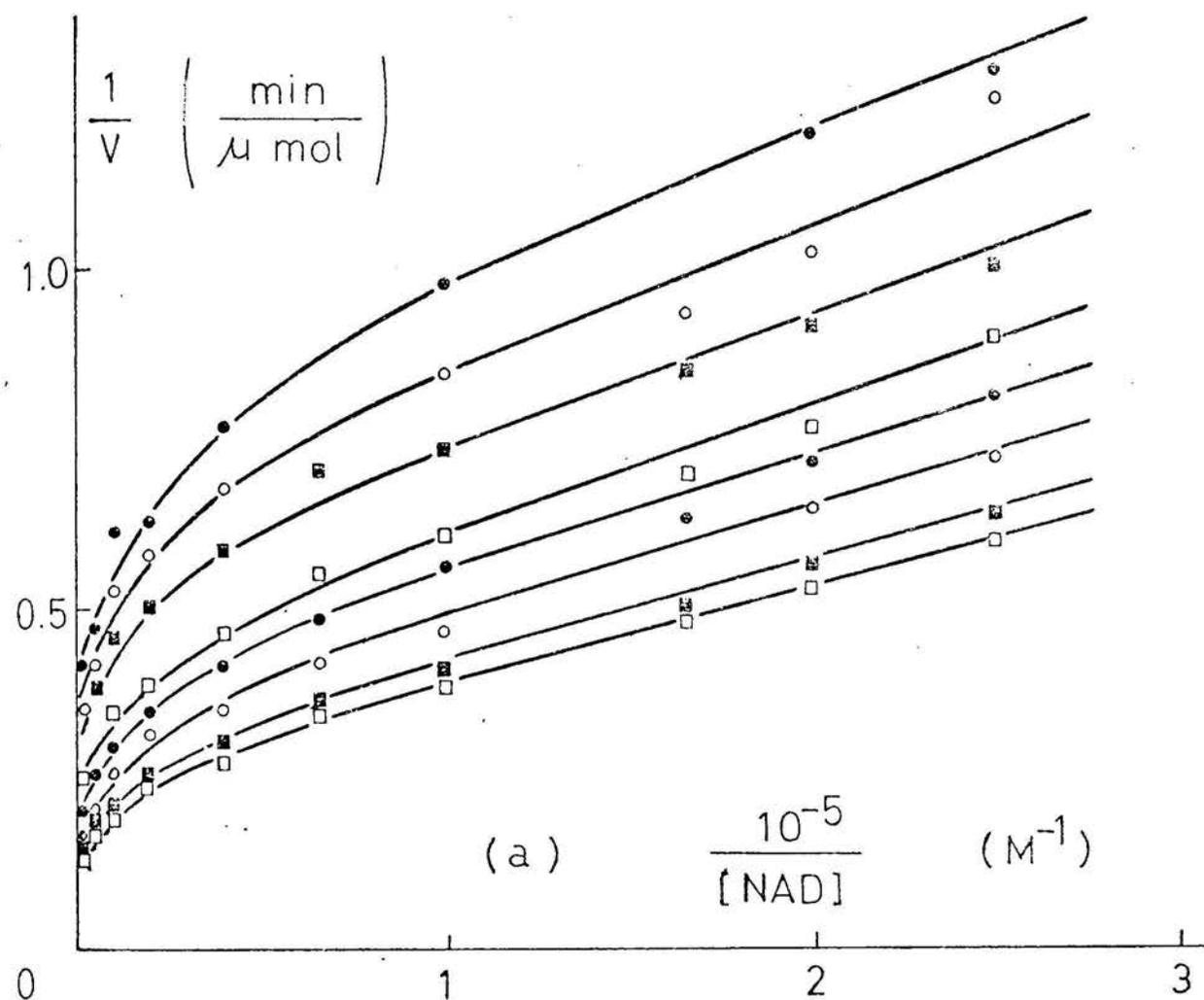


Fig.60 Cálculo de los parámetros reales ($S_{\text{XANTINA-NAD}^+ \text{-XDH-AC URICO-NADH}$). Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0; $[XDH] = 16U/ml$
 De abajo a arriba: $[xantina] \times 10^5 M^{-1} = 10; 6; 3; 2; 1,5; 1; 0,8; 0,6$
 (a) Representación de Lineweaver-Burck
 (b) Representación secundaria de Vestling-Florini

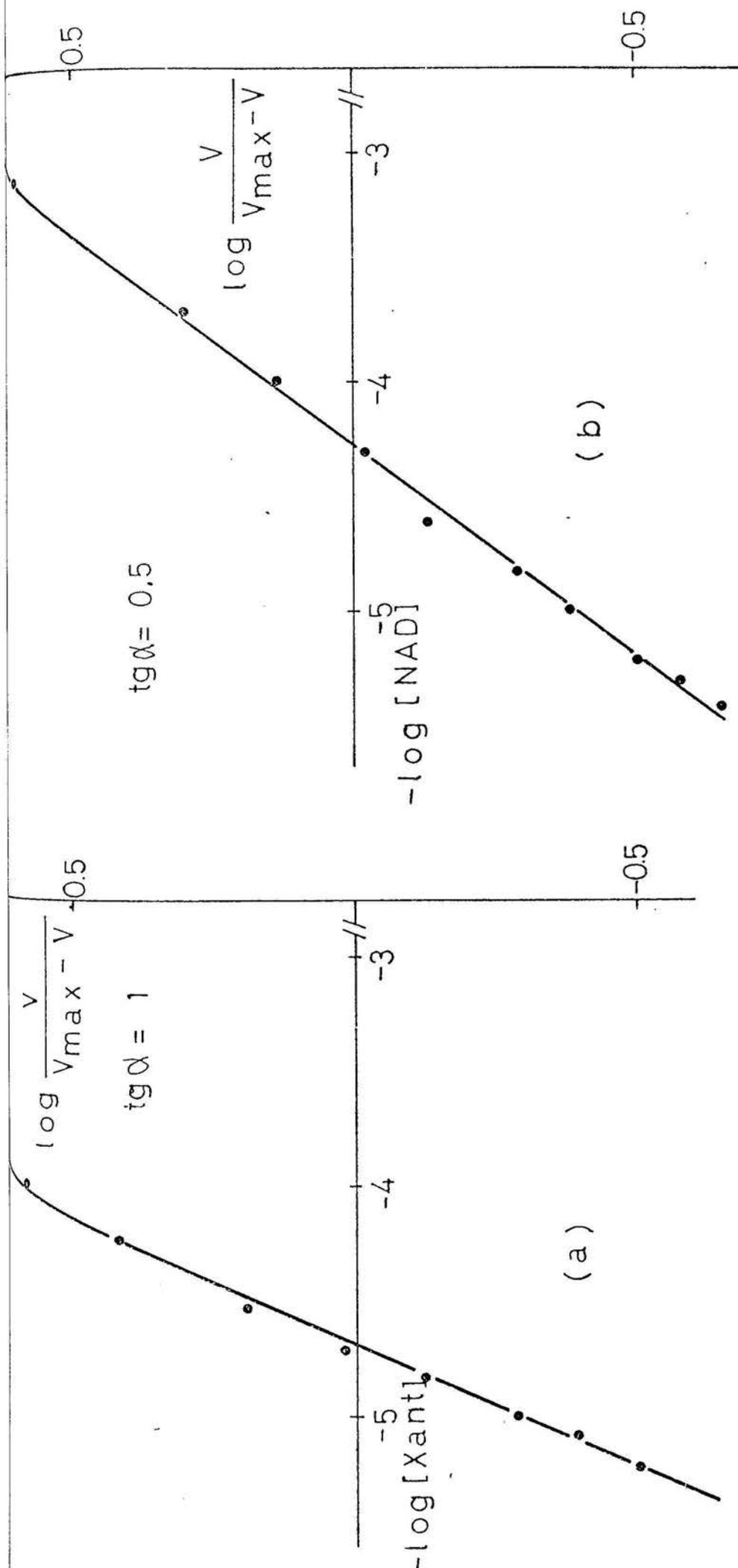


Fig. 61 Representación de Hill
 (a) Correspondiente a la fig. 60 b
 (b) Correspondiente a la fig. 59 b

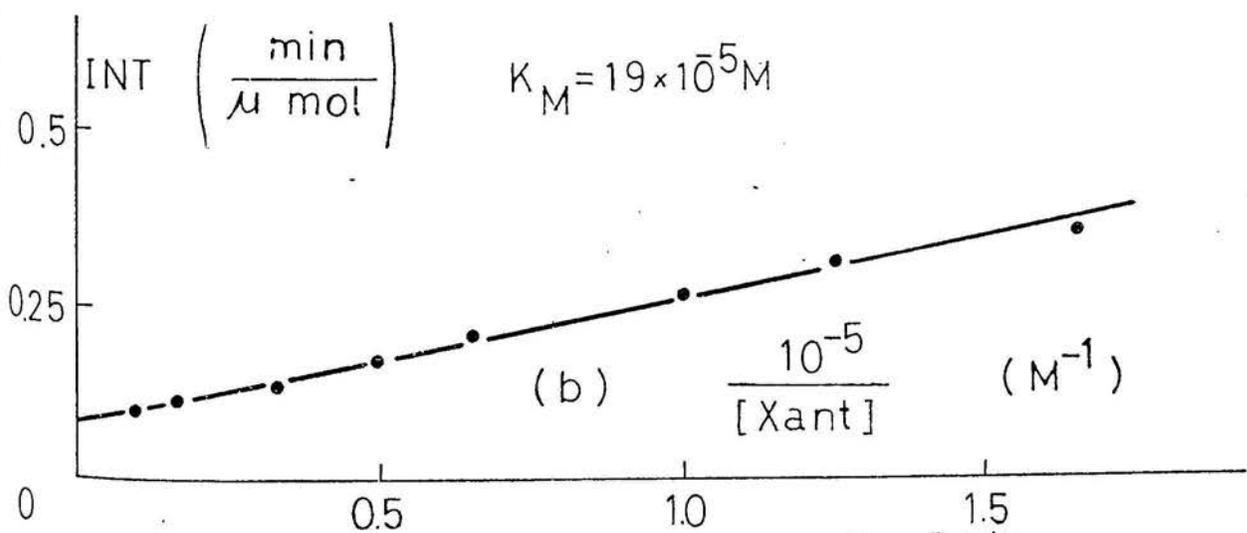
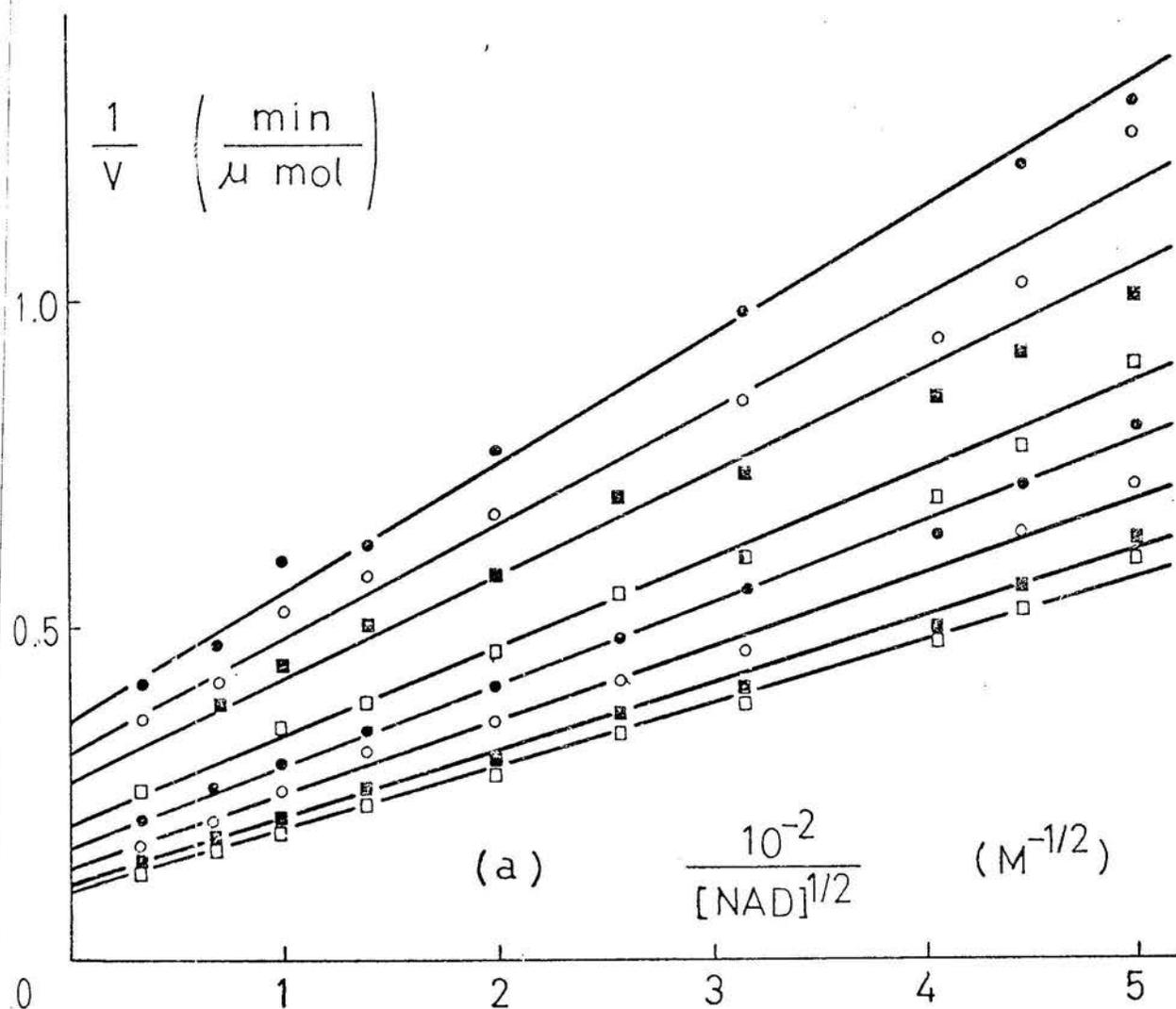


Fig. 62(a) Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NAD}]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 60 a
 (b) Representación secundaria de Vestling-Florini

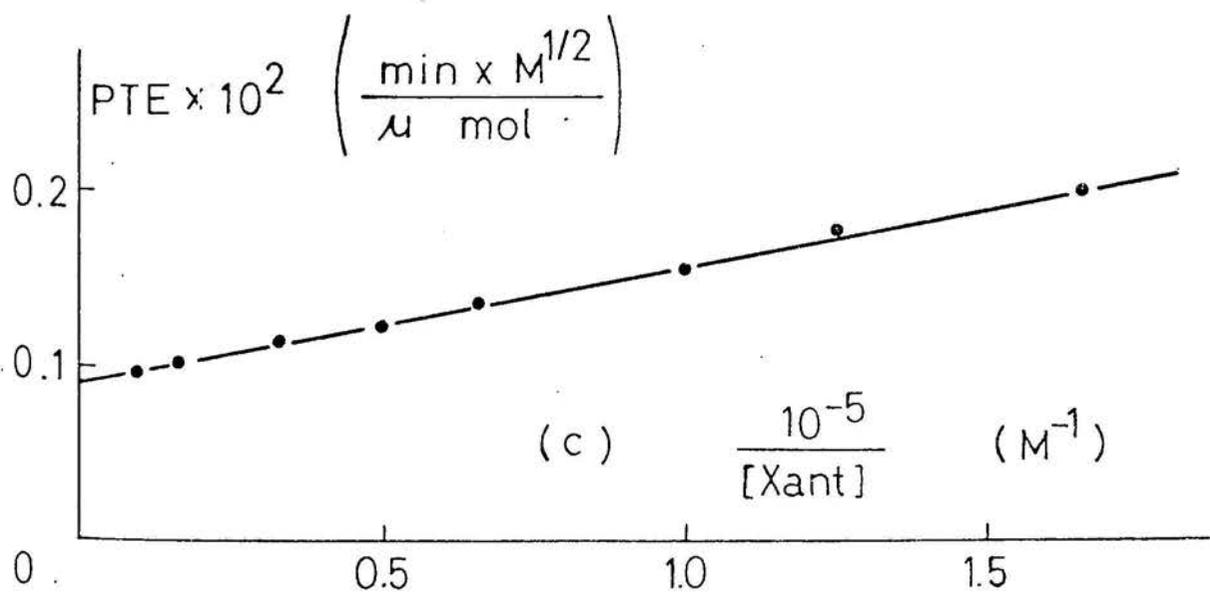
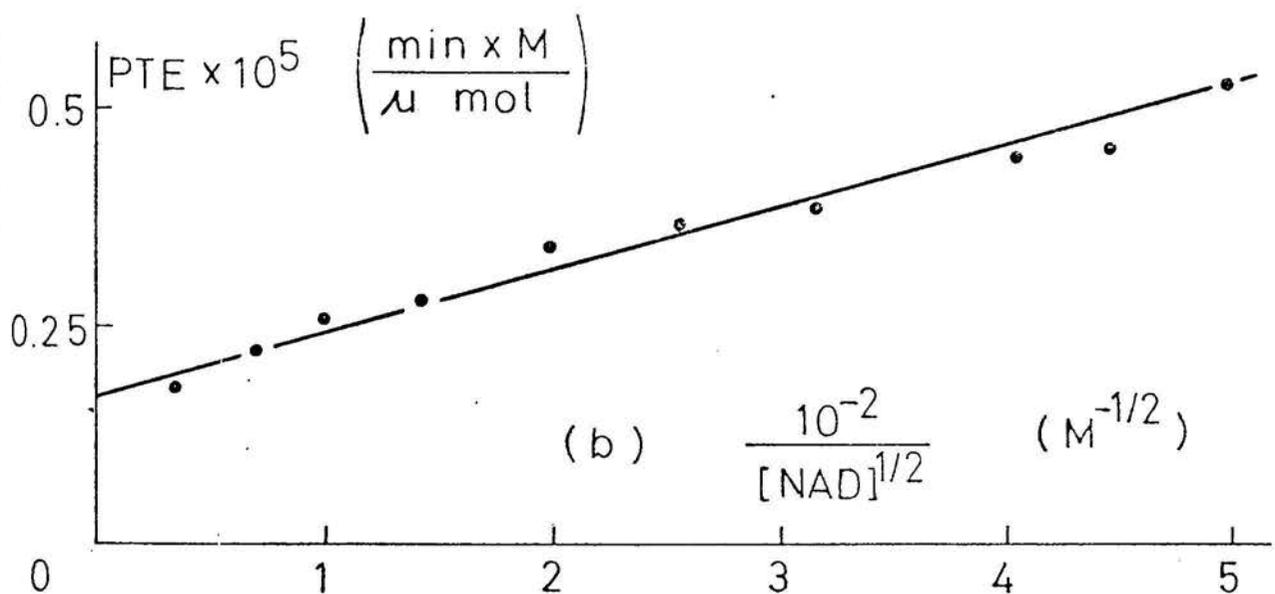
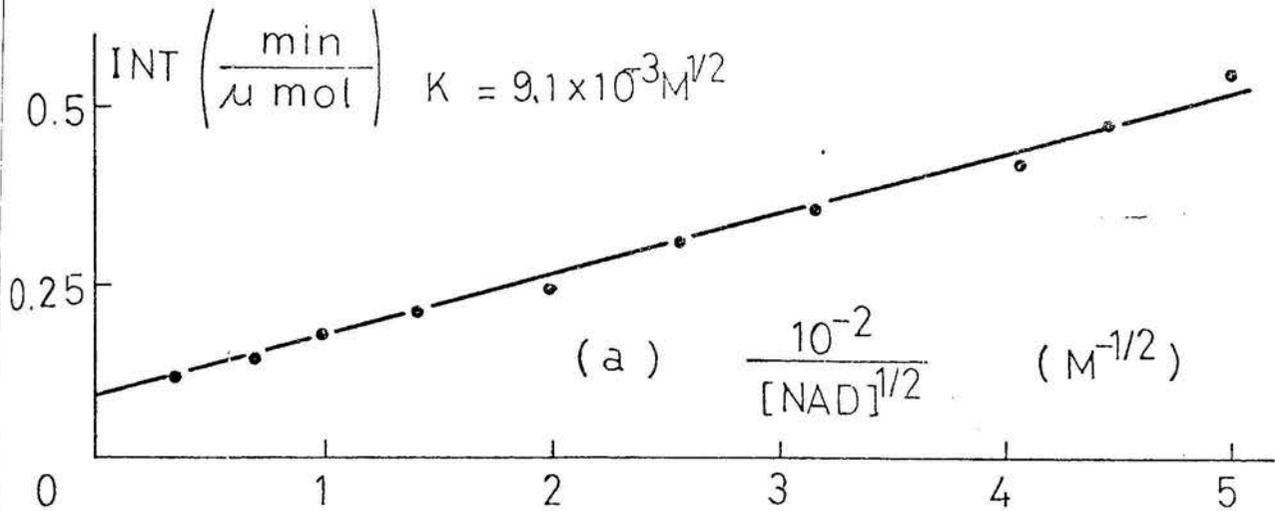


Fig. 63 (a) Representación de intersecciones frente a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 59 a
 (b) Representación secundaria de pendientes frente a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$ correspondiente a la fig. 59 a
 (c) Representación secundaria de pendientes frente a $1/[\text{xantina}]$ correspondiente a la fig. 62 a

se efectuó igualmente frente a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$, obteniéndose de esta forma una representación lineal (fig. 63 a).

Así, a partir de las representaciones de Vestling-Florini de las fig. 62 b y 63 a, se pudieron determinar los valores de los parámetros característicos del sistema. De estos resultados se deduce que en la expresión de $1/v$ la xantina y el NAD^+ vienen afectados fundamentalmente por los exponentes $2/3$ y $1/2$ respectivamente.

4.6.10 INHIBICION POR EXCESO DE SUSTRATO SOBRE LAXDH EN EL SISTEMA XANTINA- NAD^+ -XDH-AC.URICO-NADH

Se procedió a determinar el carácter de la inhibición por exceso de cada uno de los sustratos, la xantina y el NAD^+ .

4.6.10.1 Inhibición por exceso de xantina

A partir de la concentración saturante de xantina (2×10^{-4} M), aparece el fenómeno de inhibición por exceso de dicho sustrato.

Se procedió a determinar cinéticamente el citado fenómeno, utilizando concentraciones de xantina de hasta 3×10^{-3} M.

En la representación de Lineweaver-Burck con respecto al sustrato variable (NAD^+) aparece desviación de la linealidad (fig. 64 a). De acuerdo con los resultados anteriores, se procedió a representar $1/v$ frente a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$ apareciendo en este caso una representación lineal (fig. 64 b); la inhibición es de tipo no competitivo mezclado. La representación secundaria de las pendientes así como la de las intersecciones es de carácter lineal frente a la xantina inhibidora (fig. 64 c y 64 d).

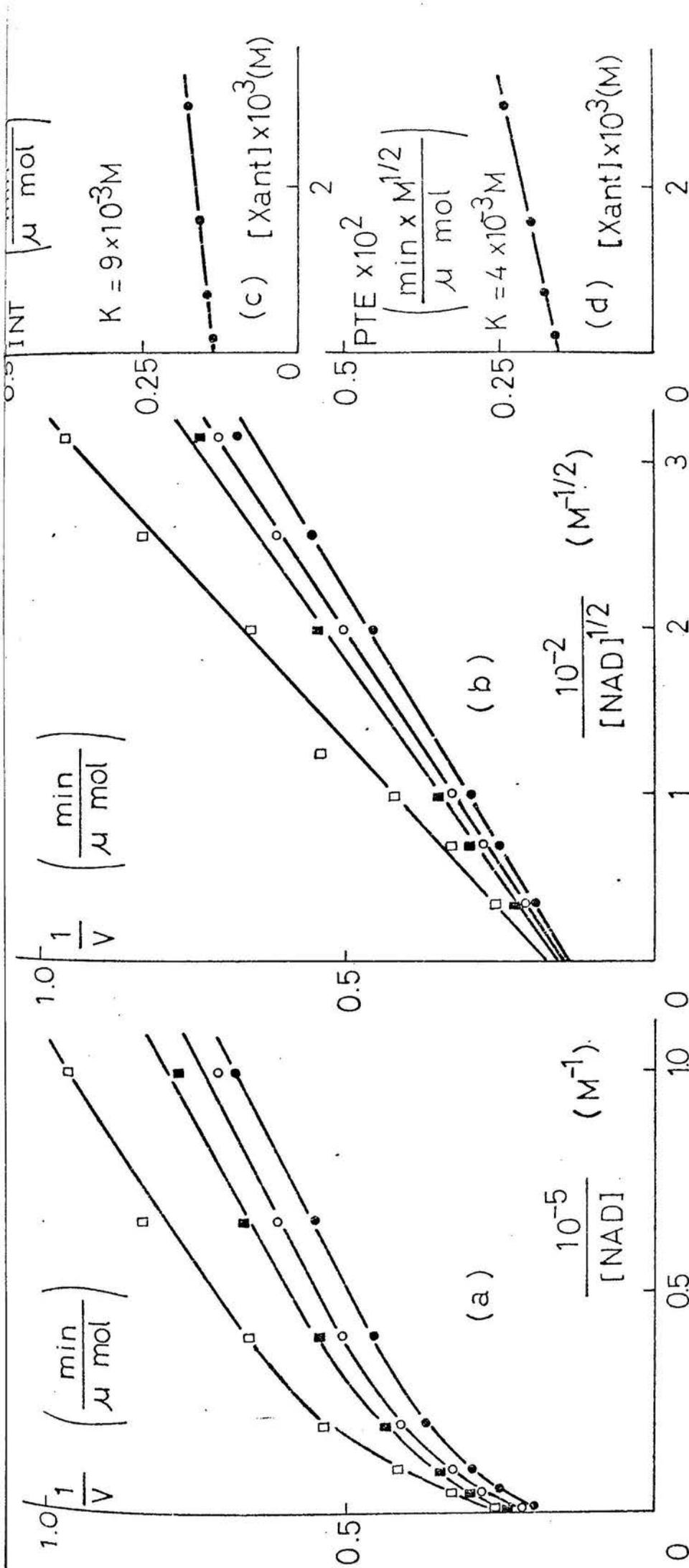


Fig. 64 Inhibición de la XDH por exceso de xantina (Sa XANTINA-NAD⁺-XDH-AC. URICO-NADH)

Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0 ; [XDH]= 16 U/ml ; De abajo a arriba [xantina]x10⁴M⁻¹=2;7;16;30

(a) Representación de Lineweaver-Burck

(b) Representación de 1/v frente a 1/[NAD⁺]^{1/2}

(c) Representación secundaria de intersecciones frente a [xantina] correspondiente a la fig. 64 b

(d) Representación secundaria de pendientes frente a [xantina] correspondiente a la fig. 64 b

4.6.10.2 Inhibición por exceso de NAD⁺

Las concentraciones de NAD⁺ superiores a la saturante ($1,4 \times 10^{-3}$ M), ejercen inhibición sobre la XDH. Se procedió a determinar el carácter de esta inhibición, utilizando concentraciones de sustrato NAD⁺ hasta $7,5 \times 10^{-3}$ M.

La representación de Lineweaver-Burck correspondiente a la xantina como sustrato variable, es de carácter lineal y se obtiene una inhibición de tipo no competitivo mezclado con tendencia a la incompetividad (fig. 65 a). El NAD⁺ como inhibidor afecta de forma más acusada a la intersección que a la pendiente. Las representaciones secundarias de pendientes e intersecciones frente a $(\overline{\text{NAD}^+})^{1/2}$ son de carácter lineal (fig. 65 b y 65 c).

4.6.11 INHIBICION POR PRODUCTO

Para completar el conocimiento cinético del mecanismo en estudio, se han determinado el carácter de las inhibiciones que los distintos productos de la reacción ejercen con respecto a cada uno de los sustratos, considerando el otro como sustrato fijo a concentración saturante como no saturante.

4.6.11.1 Inhibición por ácido úrico

Se efectuó en primer lugar el estudio de la inhibición que sobre la XDH ejerce el ácido úrico con respecto a los dos sustratos de la reacción, la xantina y el NAD⁺.

4.6.11.1.1 Xantina como sustrato variable

a)- Concentración constante y no saturante de NAD⁺ (5×10^{-4} M)

Las concentraciones de ácido úrico utilizadas como inhibidores

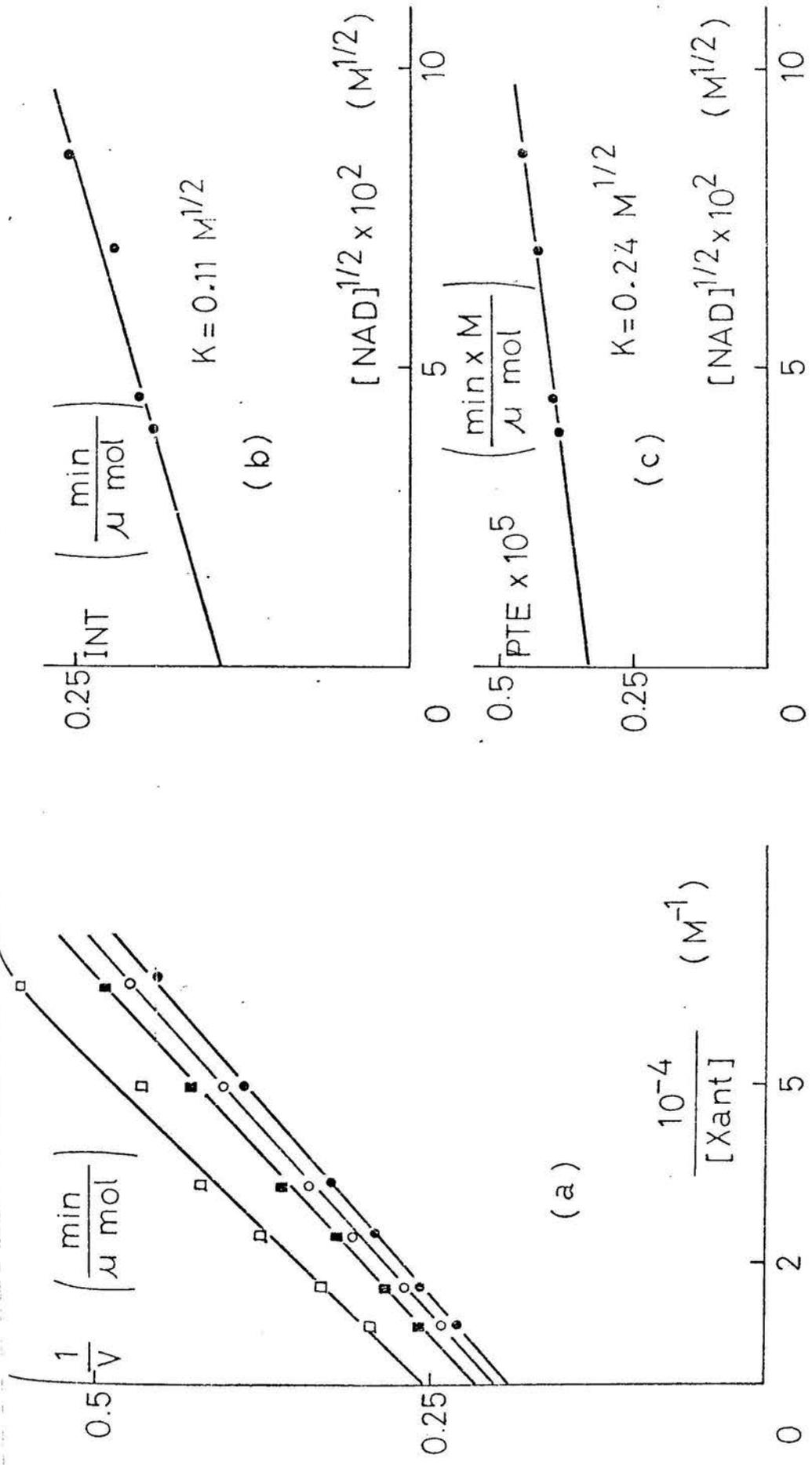


Fig. 65 Inhibición de la XDH por exceso de NAD^+ (Sa XANTINA- NAD^+ -XDH-AC.URICO-NADH)
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0; $[\text{XDH}] = 16 \text{ U/ml}$; De arriba a arriba: $[\text{NAD}^+] \times 10^3 \text{ M}^{-1} = 1, 6; 2; 5; 7, 5$

(a) Representación de Lineweaver-Burck
 (b) Representación secundaria de intersecciones frente a $[\text{NAD}^+]^{1/2}$
 (c) Representación secundaria de pendientes frente a $[\text{NAD}^+]^{1/2}$

fueron 1×10^{-4} , 4×10^{-4} y 1×10^{-3} M.

La representación de Lineweaver-Bruck de $1/v$ frente a $1/[Xantina]$ da lugar a líneas rectas resultando una inhibición de tipo no competitivo.puro (fig. 66 a).

La representación secundaria de las pendientes resulta ser lineal frente a $[ác.úrico]^{1/2}$ y la de las intersecciones frente a $[ác.úrico]$ (fig. 66 b) y 66 c).

b)- Concentración constante y saturante de NAD^+ ($1,4 \times 10^{-3}$ M)

Las concentraciones de ácido úrico utilizadas como inhibidoras fueron 1×10^{-4} , 4×10^{-4} y 8×10^{-4} M.

Los resultados de las experiencias son análogos a los obtenidos para el NAD^+ no saturante, como puede observarse en la representación de Lineweaver-Burck (fig. 67 a) y en las secundarias de las pendientes e intersecciones (fig. 67 b y 67 c).

4.6.11.1.2 NAD^+ como sustrato variable

a)-Concentración constante y no saturante de xantina (2×10^{-5} M)

Las concentraciones de ácido úrico utilizadas como inhibidoras fueron 3×10^{-4} , 6×10^{-4} y 1×10^{-3} M.

La representación de Lineweaver-Burck no es lineal, aparecen parábolas convexas (fig. 68 a). La representación de $1/v$ frente a $1/[NAD^+]^{1/2}$ es lineal (fig. 68 b). Las representaciones secundarias de las pendientes e intersecciones frente a la concentración de ácido úrico, obtenidas a partir de la fig. 68 b, son de carácter lineal con respecto al ácido úrico (fig. 68 c y 68 d).

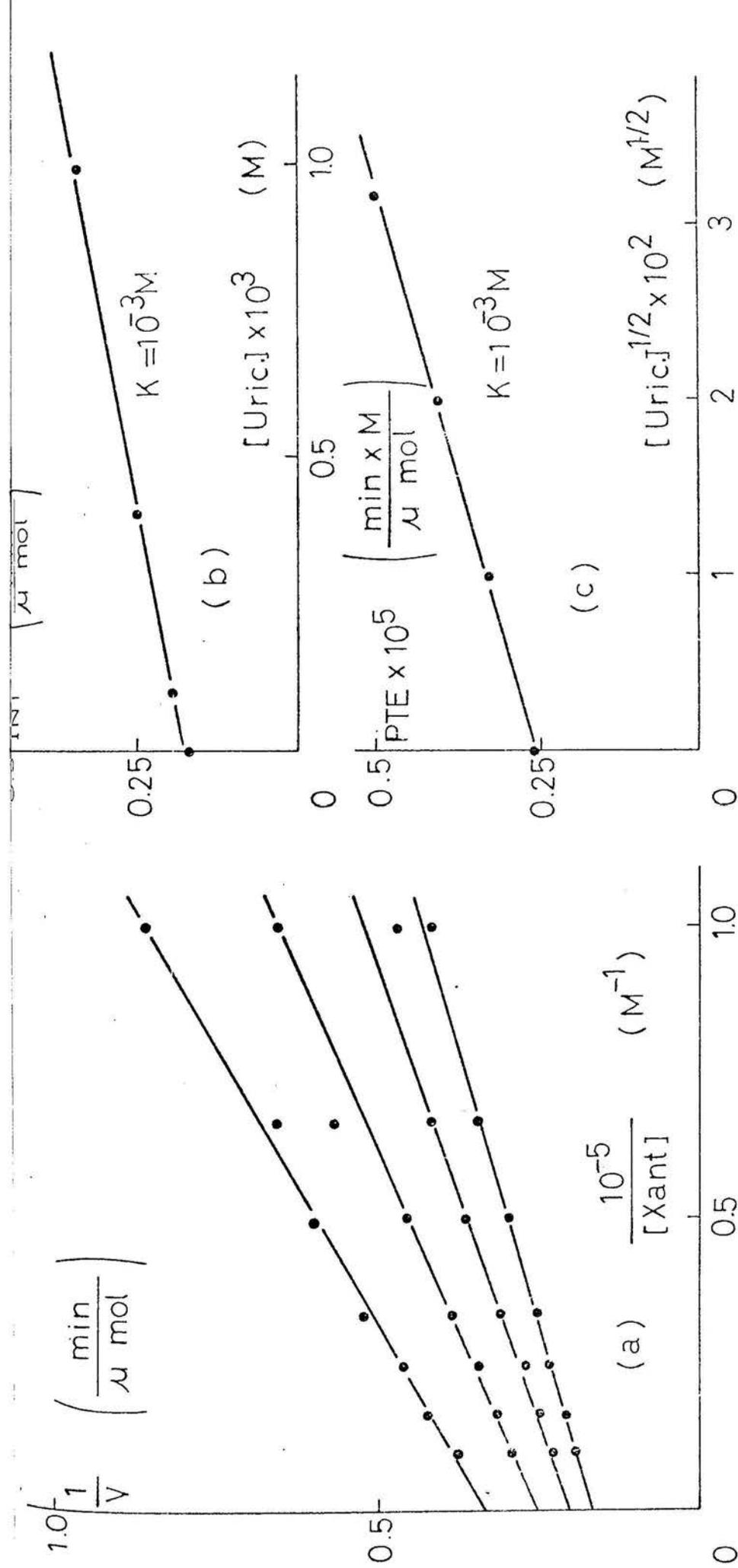


Fig. 66 Inhibición de la XDH por ácido úrico (Se XANTINA-NAD⁺-XDH-AC.URICO-NADH) ; $[NAD^+]_{no\ sat.} = 5 \times 10^{-4} M$
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0; $[XDH] = 16$ U/ml; De arriba a arriba: $[ác.úrico] \times 10^4 M^{-1} = 0; 1; 4; 10$

(a) Representación de Lineaveaver-Burck

(b) Representación secundaria de intersecciones frente a $[ác.úrico]$

(c) Representación secundaria de pendientes frente a $[ác.úrico]$

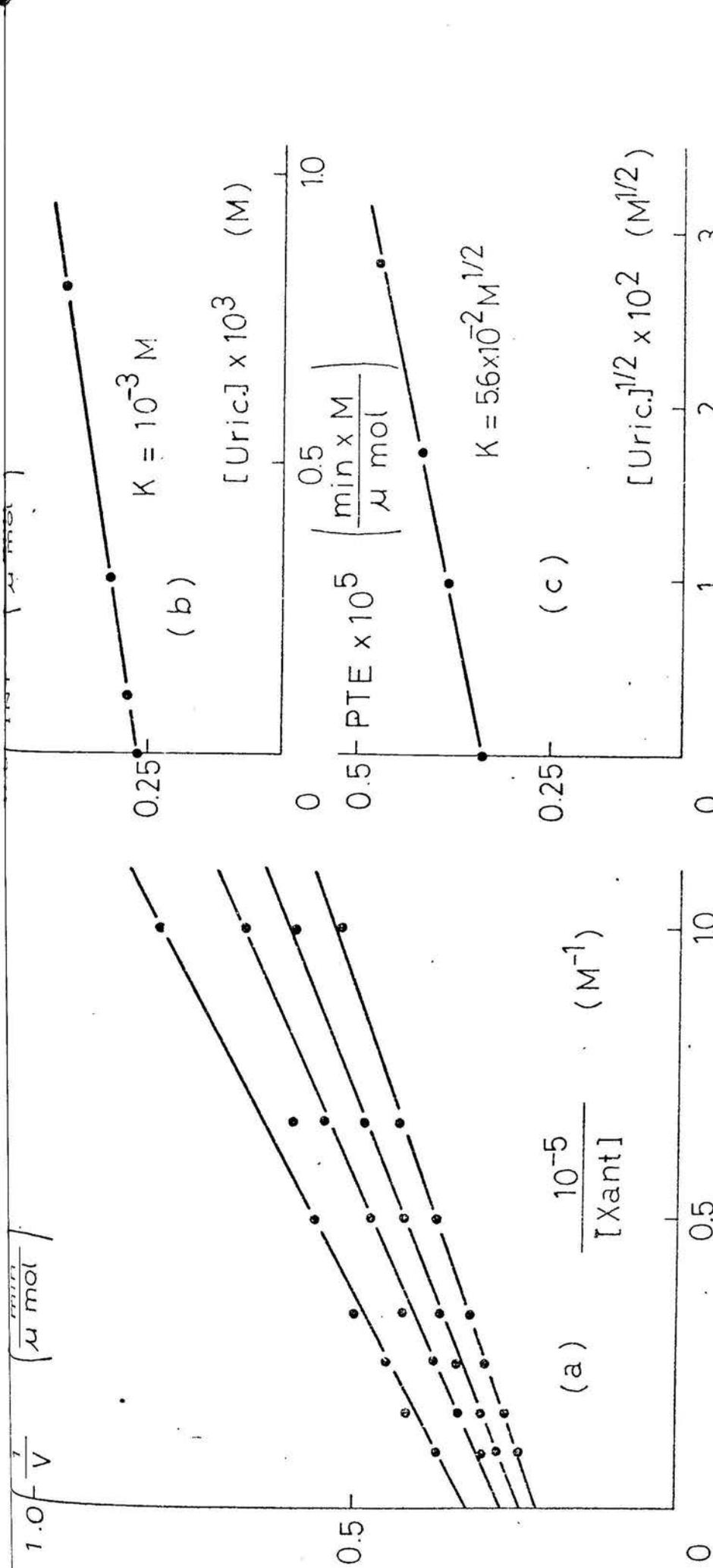


Fig. 67 Inhibición de la XDH por ácido úrico (SAXANTINA-NAD⁺-XDH-AC.URICO-NADH); $[NAD^+]_{\text{sat.}} = 1,4 \times 10^{-3} \text{ M}$
 Tampón de fosfato sódico 50 mM pH 8,0; $[XDH] = 16 \text{ U/ml}$; De arriba a arriba: $[\text{ác.úrico}] \times 10^4 \text{ M}^{-1} = 0; 1; 3; 8$

- (a) Representación de Lineweaver-Burck
- (b) Representación secundaria de intersecciones frente a $[\text{ác.úrico}]$
- (c) Representación secundaria de pendientes frente a $[\text{ác.úrico}]$

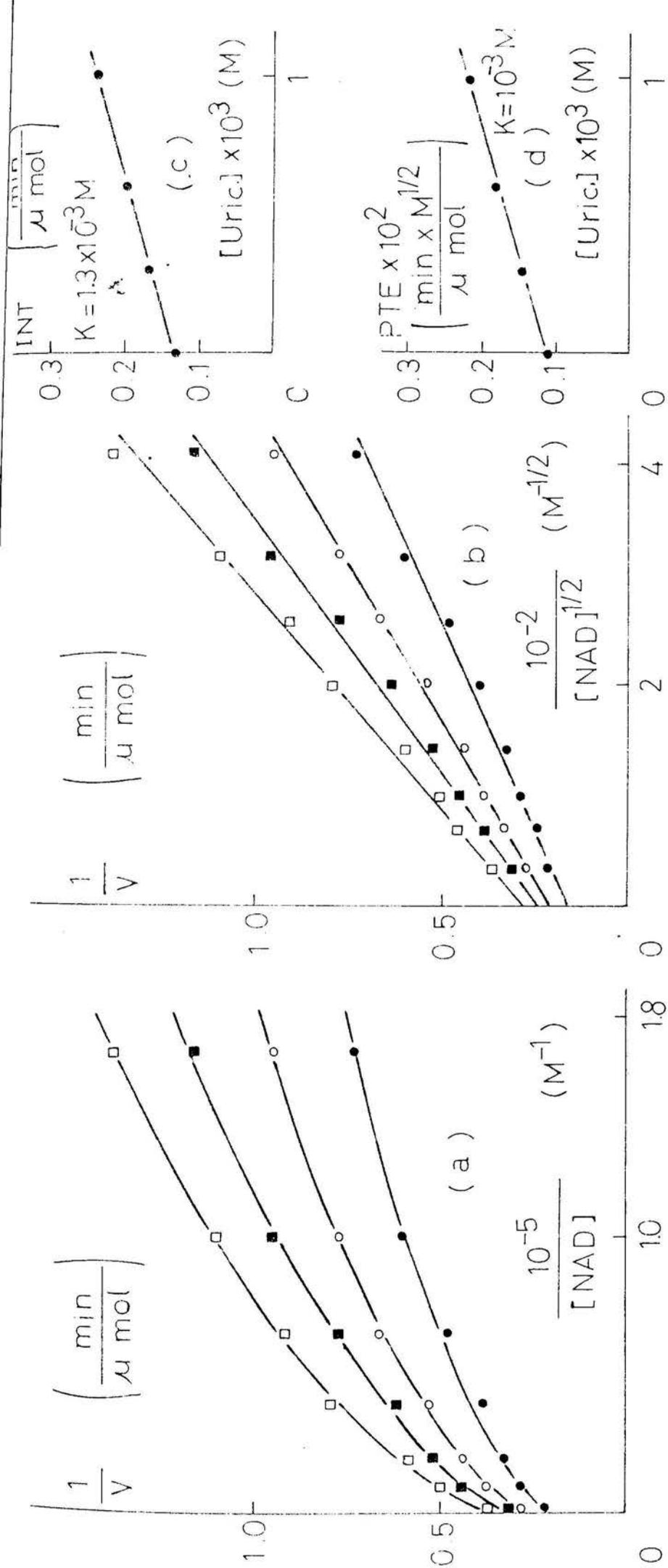


Fig. 68 Inhibición de la XDH por ácido úrico (Se XANTINA-NAD⁺-XDH-AC.URICO-NADH) [xantina]_{no sat.} = $2 \times 10^{-5} M$

Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8 ; XDH = 16 U/ml; De abajo a arriba: [ác.úrico] $\times 10^4 M^{-1} = 0 ; 3 ; 6 ; 10$

(a) Representación de Lineweaver-Burck; (b) Representación de $1/v$ frente a $1/[NAD]^{1/2}$

(c) Representación secundaria de intersecciones frente a [ác.úrico] correspondiente a la fig. 68 b

(d) Representación secundaria de pendientes frente a [ác.úrico] correspondiente a la fig. 68 b

b)- Concentración constante y saturante de xantina (2×10^{-4} M)

Las concentraciones de ácido úrico utilizadas como inhibidoras fueron 5×10^{-4} , 8×10^{-4} y $1,1 \times 10^{-3}$ M.

Los resultados de la experiencia son análogos a los obtenidos para la xantina no saturante, como puede observarse en las representaciones de Lineweaver-Burck y de $1/v$ frente a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$ (fig. 69 a y 69 b), así como en la representación secundaria de las pendientes e intersecciones (fig. 69 c y 69 d).

4.6.11.2 Inhibición por NADH

Se efectuó a continuación, el estudio de la inhibición que sobre la XDH, ejerce el NADH con respecto a los dos sustratos de la reacción, la xantina y el NAD^+ .

4.6.11.2.1 Xantina como sustrato variable

a)- Concentración constante y no saturante de NAD^+ . (3×10^{-3} M).

Las concentraciones de NADH utilizadas como inhibidoras fueron 1×10^{-5} , 2×10^{-5} y 6×10^{-5} M.

La representación de Lineweaver-Burck da lugar a líneas rectas, pudiéndose observar una inhibición de tipo no competitivo puro (fig. 70 a).

La representación secundaria de las intersecciones y de las pendientes es lineal frente a $[\text{NADH}]^{1/2}$ (fig. 70 c y 70 b).

b)- Concentración constante y saturante de NAD^+ ($1,4 \times 10^{-3}$ M).

Las concentraciones de NADH utilizadas como inhibidoras fueron 8×10^{-6} , 2×10^{-5} y 8×10^{-5} M.

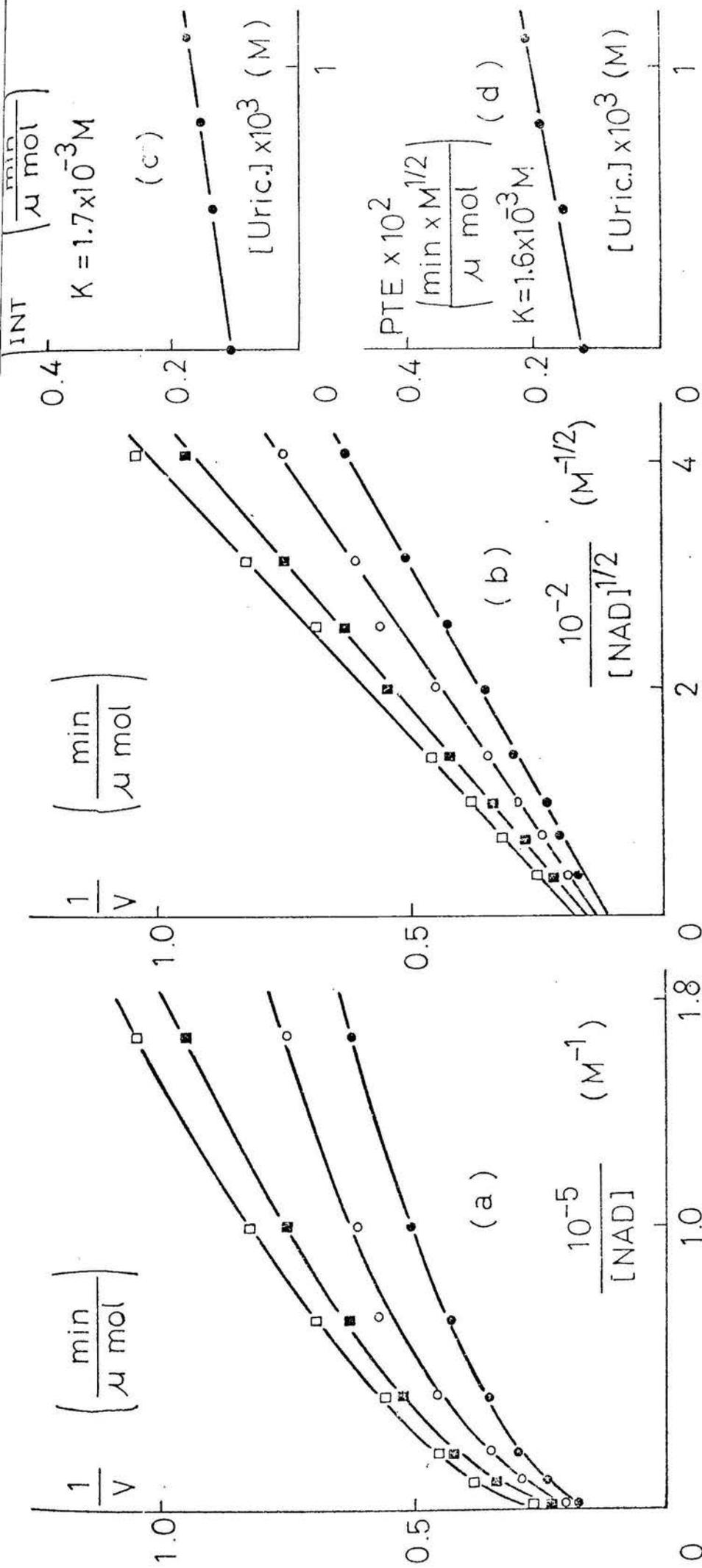


Fig. 69 Inhibición de la XDH por ácido úrico (SAXANTINA-NAD⁺-XDH-AC.URICO-NADH); [xantina]_{sat.} = $2 \times 10^{-4} \text{ M}$
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0; [XDH]=16 U/ml; De arriba a abajo: [ác.úrico] $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ = 0; 5; 8; 11

(a) Representación de Lineweaver-Burck

(b) Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NAD}^{+}]^{1/2}$

(c) Representación secundaria de intersecciones frente a [ác.úrico] correspondiente a la fig. 69 b

(d) Representación secundaria de pendientes frente a [ác.úrico] correspondiente a la fig. 69 b

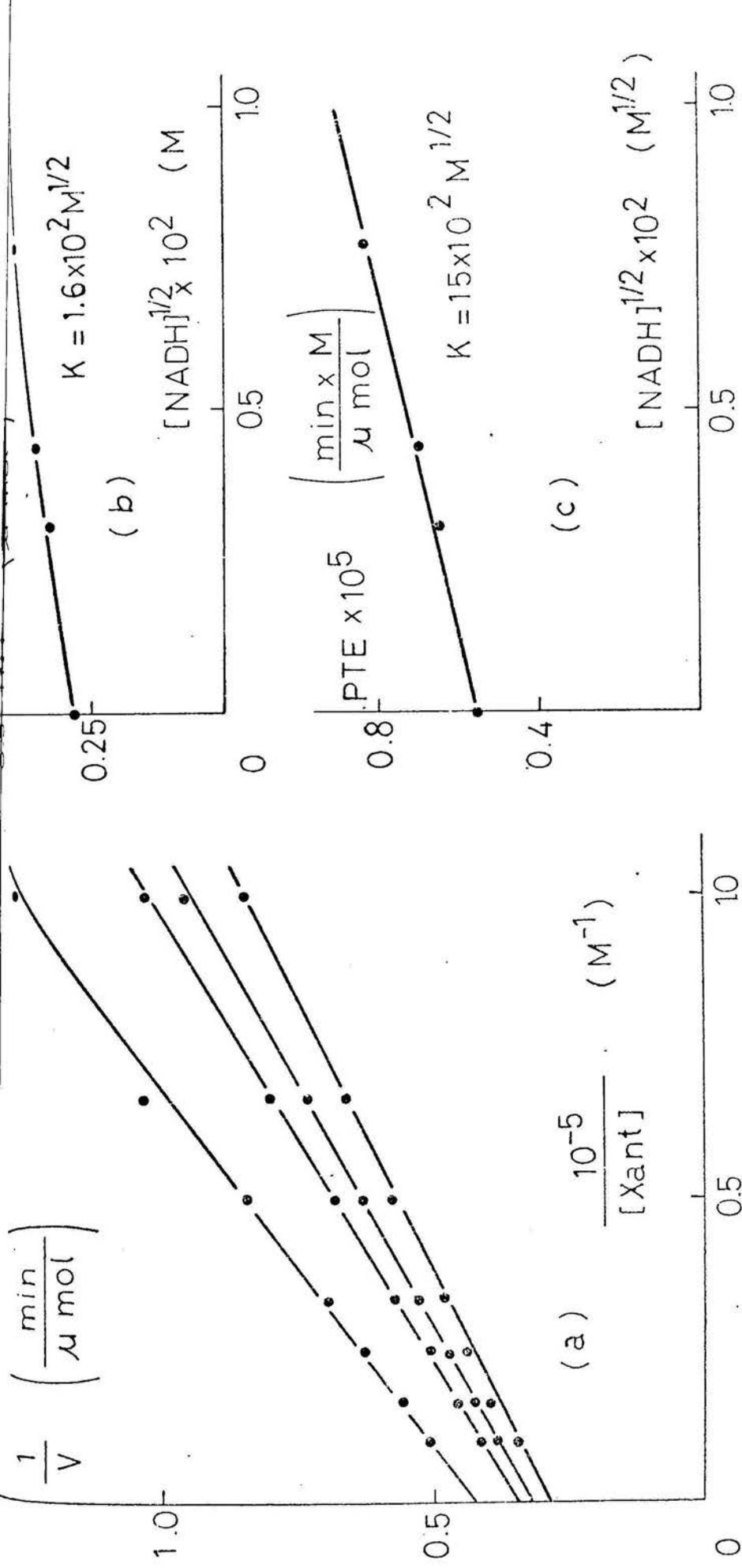


Fig. 70 Inhibición de la XDH por NADH (SAXANTINA-NAD⁺-XDH-AC.URICO-NADH); $[\text{NAD}^+]_{\text{no sat.}} = 3 \times 10^{-4} \text{ M}$
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0; $[\text{XDH}] = 16 \text{ U/ml}$; De arriba a arriba: $[\text{NADH}] \times 10^5 \text{ M}^{-1} = 0; 1; 2; 6$
 (a) Representación de Lineweaver-Burck
 (b) Representación secundaria de intersecciones frente a $[\text{NADH}]^{1/2}$
 (c) Representación secundaria de pendientes frente a $[\text{NADH}]^{1/2}$

Los resultados de esta experiencia son análogos a los obtenidos para el NAD^+ no saturante, como puede observarse en la representación de Lineweaver-Burck (fig. 71 a), y en las representaciones secundarias de las pendientes e intersecciones frente a $[\text{NADH}]^{1/2}$ (fig. 71 b y 71 c).

4.6.11.2.2 NAD^+ como sustrato variable

a)- Concentración constante y no saturante de xantina (2×10^{-5} M).

Las concentraciones de NADH utilizadas como inhibidoras fueron 4×10^{-6} , 1×10^{-5} y 2×10^{-5} M.

La representación de Lineweaver-Burck resulta ser no lineal, apareciendo curvas que se adaptan a parábolas convexas (fig. 72 a). La representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$ tampoco se adapta a la linealidad, apareciendo parábolas convexas (fig. 72 b).

Con estos resultados no resulta posible determinar el efecto que el NADH como inhibidor ejerce con respecto al NAD^+ .

b)- Concentración constante y saturante de xantina (2×10^{-4} M).

Las concentraciones de NADH utilizadas como inhibidoras fueron 4×10^{-6} , 1×10^{-5} y 2×10^{-5} M.

Los resultados de estas experiencias son análogos a los obtenidos para la xantina no saturante, como puede observarse en las representaciones de Lineweaver-Burck y de $1/v$ frente a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$ (fig. 73 a y 73 b), no pudiéndose tampoco en este caso determinar el efecto inhibitor que sobre la XDH ejerce el NADH.

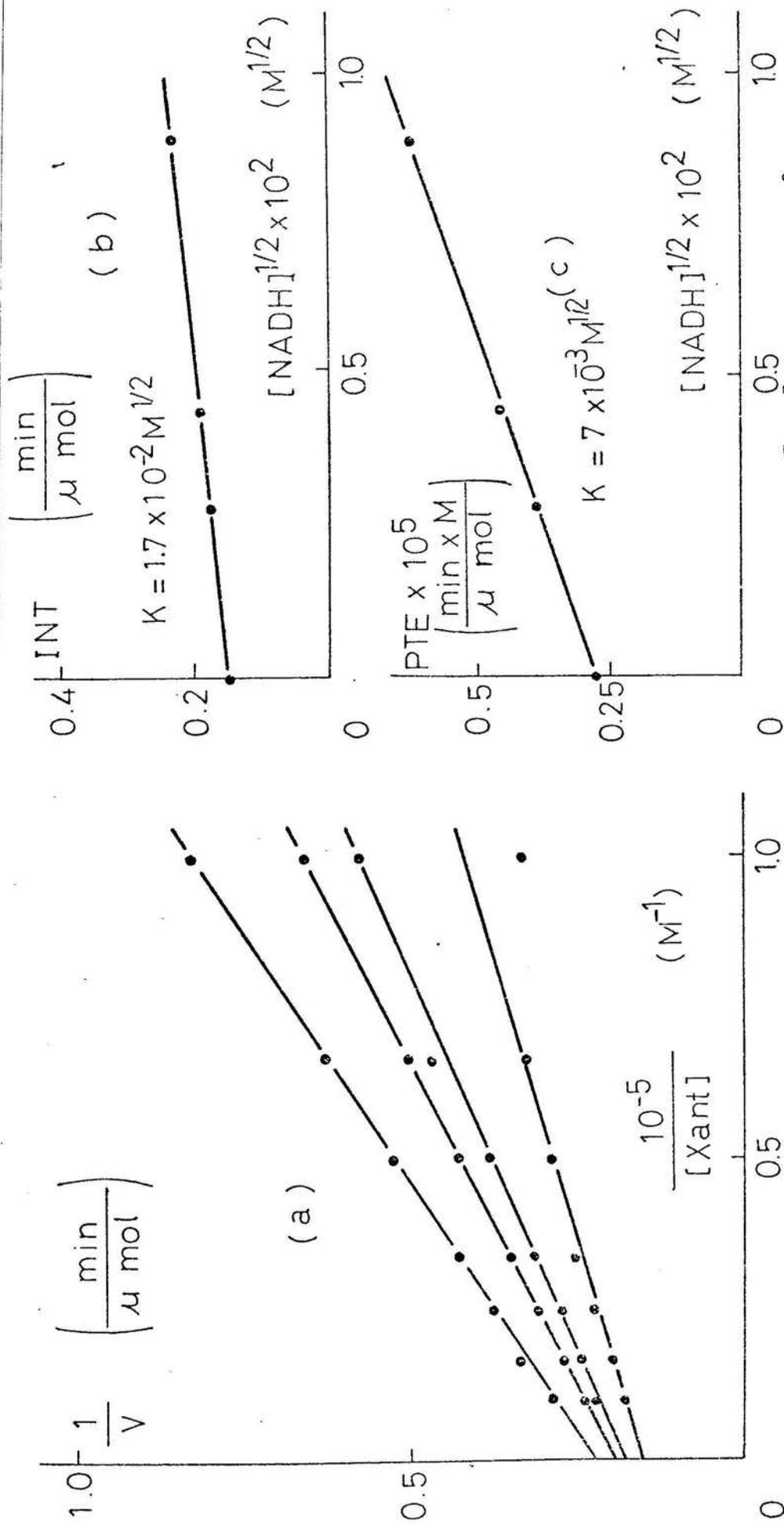


Fig. 71 Inhibición de la XDH por NADH (Sa XANTINA-NAD⁺-XDH-AC.URICO-NADH); [NAD⁺]_{sat.} = 1,4x10⁻³M
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0; [XDH]=16 U/ml; De abajo a arriba: [NADH]x10⁵M⁻¹=0;0,8;2;8
 (a) Representación de Lineweaver-Burck
 (b) Representación secundaria de intersecciones frente a [NADH]^{1/2}
 (c) Representación secundaria de pendientes frente a [NADH]^{1/2}

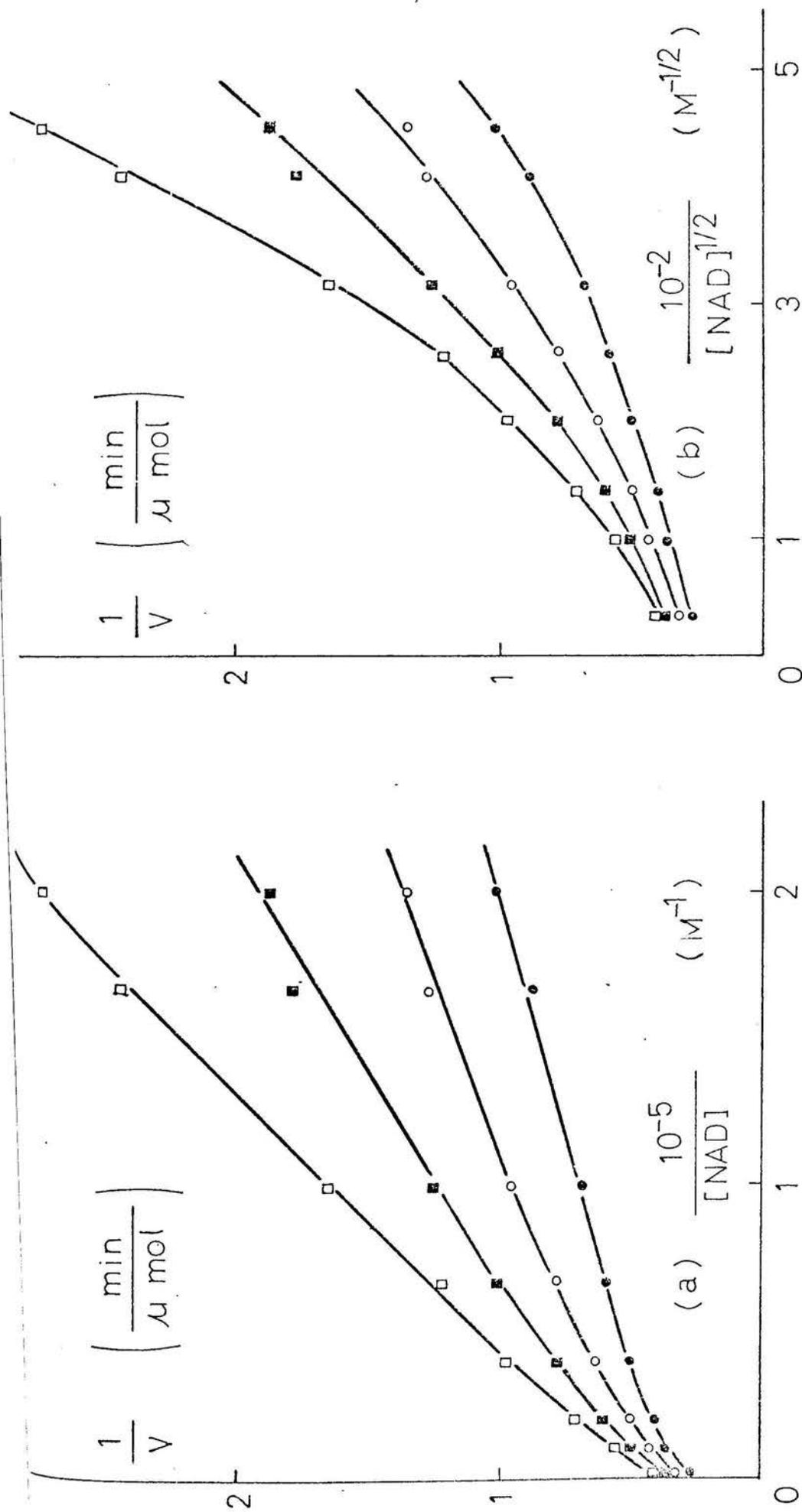


Fig. 72 Inhibición de la XDH por NADH (Saxantina-NAD⁺-XDH-AC. URICO-NADH); $[\text{NADH}]_{\text{no sat}} = 2 \times 10^{-5} \text{M}$
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0; $[\text{XDH}] = 16 \text{ U/ml}$; De arriba a arriba: $[\text{NADH}] \times 10^5 \text{M}^{-1} = 0; 0,4; 1; 2$
 (a) Representación de Lineweaver-Burck
 (b) Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NAD}]^{1/2}$

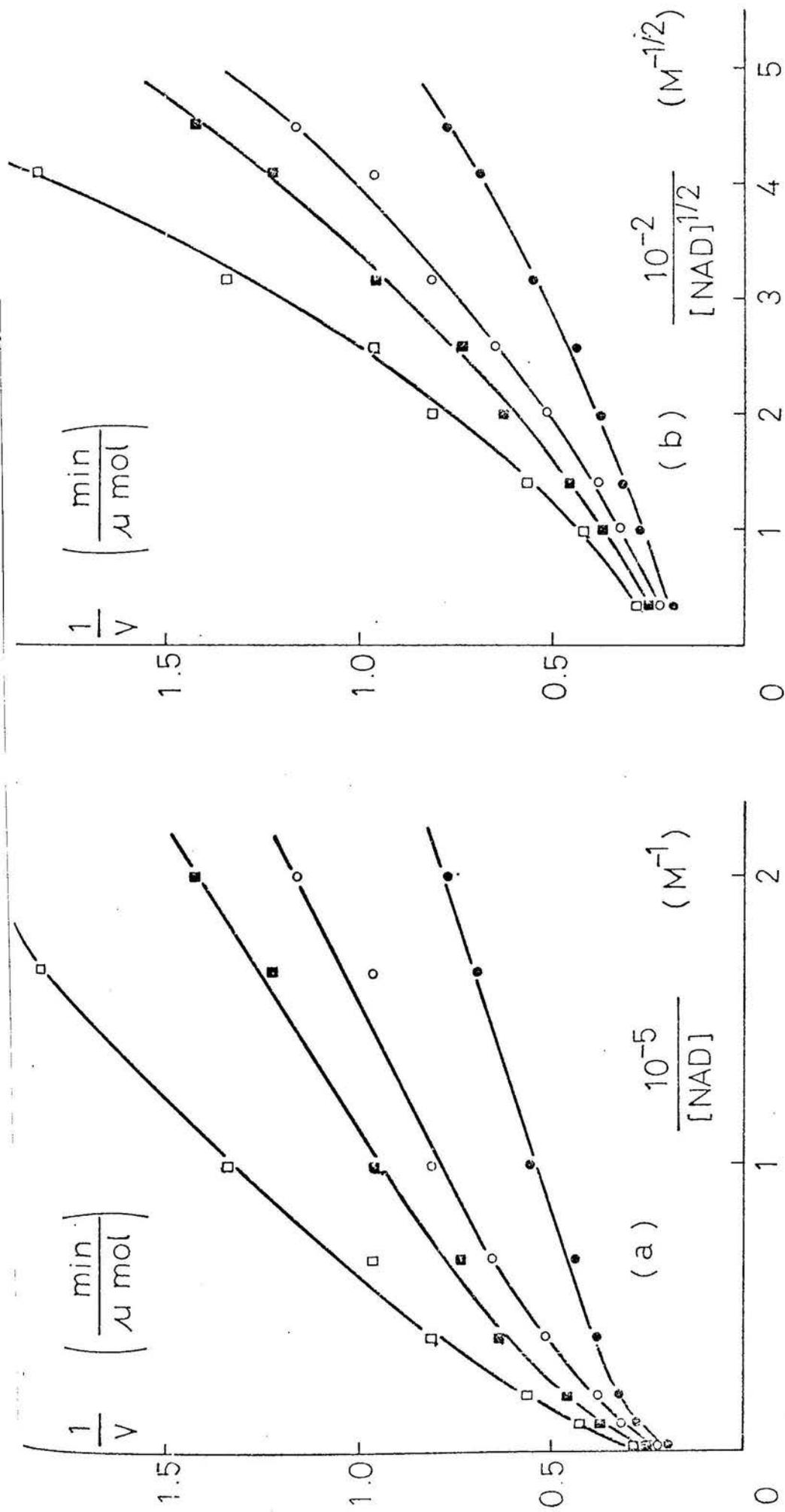


Fig. 73 Inhibición de la XDH por NADH (Se XANTINA-NAD⁺-XDH-AC.URICO-NADH); $[\text{NAD}]_{\text{sat}} = 2 \times 10^{-4} \text{M}$

Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0 ; $[\text{XDH}] = 16 \text{ U/ml}$; De abajo a arriba: $[\text{NADH}] \times 10^5 \text{M}^{-1} = 0; 0,4; 1; 2$

(a) Representación de Lineweaver-Burck

(b) Representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NAD}^{+}]^{1/2}$

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

Utilizando los datos obtenidos en el estudio de las reacciones diaforásica y oxidásica, y teniendo en cuenta los resultados del estudio de las inhibiciones por sustrato y por producto en la reacción deshidrogenásica, se podría pensar en un mecanismo tal como el reflejado en la fig. 74.

Del esquema de reacción de la fig. 74 es posible deducir la ecuación de velocidad por el método de King y Altman. De acuerdo con este método se llega a la ecuación siguiente (106) (107):

$$v = \frac{V_{\text{máx}} AB^{1/2}}{\text{denominador}}$$

siendo el valor del denominador:

$$\begin{aligned} &K_A + K_B B^{1/2} + K_C B + AB^{1/2} + K_D A + K_E AB + K_F A^2 B^{1/2} + K_G A^2 + \\ &K_H Q^{1/2} / B^{1/2} + K_I A Q^{1/2} / B^{1/2} + K_J A^2 Q^{1/2} / B^{1/2} + K_K Q^{1/2} + K_L B^{1/2} Q^{1/2} + \\ &+ K_M A Q^{1/2} + K_N A^2 Q^{1/2} + K_P A B^{1/2} Q^{1/2} + K_Q A P + K_R A B^{1/2} P + \\ &K_S B^{1/2} P^{1/2} + K_T Q^{1/2} P / B^{1/2} + K_V A Q^{1/2} P / B^{1/2} + K_X Q^{1/2} P + K_Z A Q^{1/2} P + \\ &K_W A P Q / B^{1/2} + K_Y P Q / B^{1/2} \end{aligned}$$

en el cual las distintas constantes poseen los valores que se indican en la tabla XXII.

La expresión de 1/v que se obtiene a partir de la ecuación de velocidad es la siguiente:

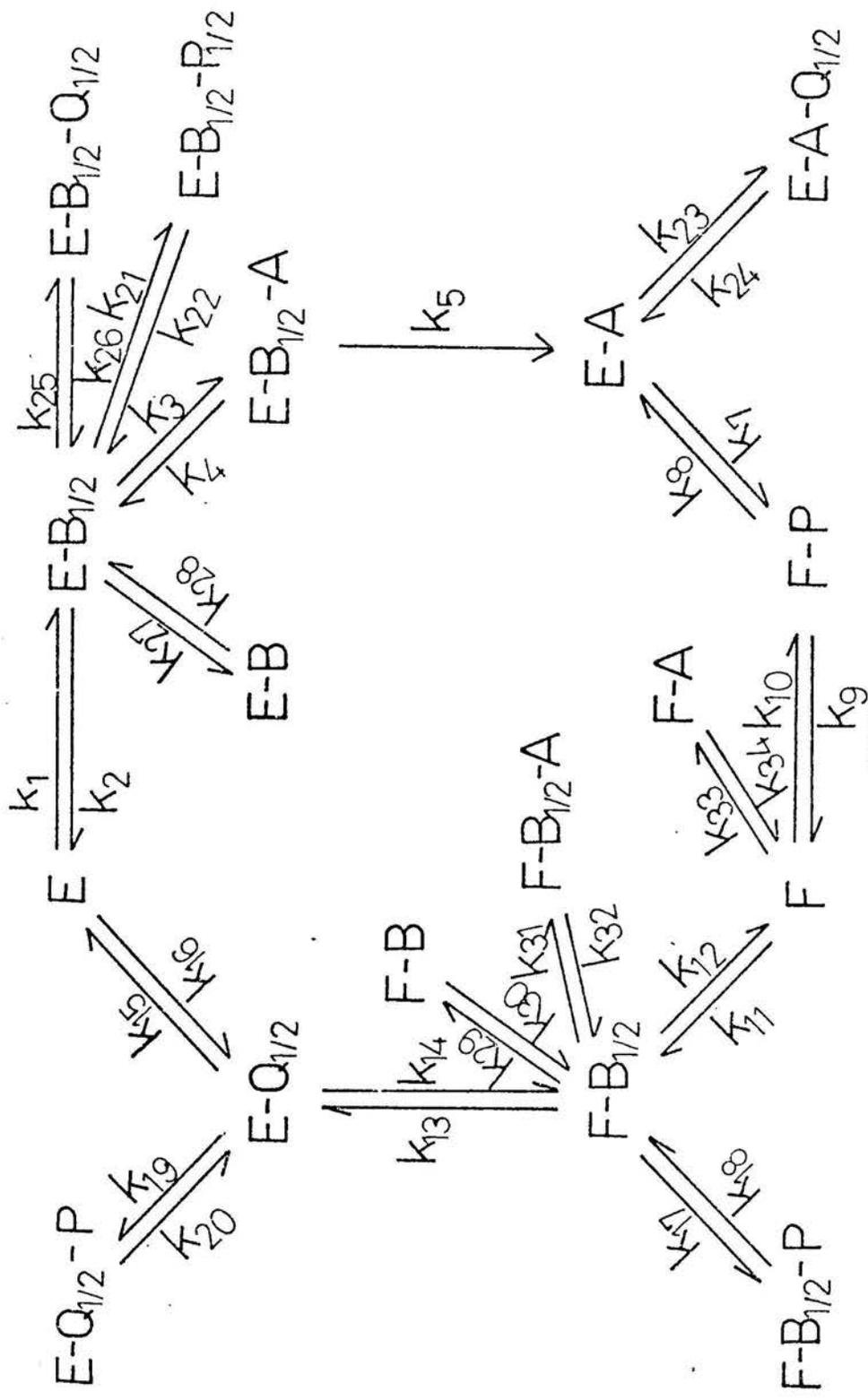


Fig. 74 Mecanismo reaccional de la XDH (Tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,0)
 A= xantina; B= NAD⁺; P= ácido úrico; Q= NADH; E= XDH_{oxidada}; F= XDH_{reducida}

T A B L A XXII

SIGNIFICACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE LA ECUACION DE VELOCIDAD DE LA REACCION DESHIDROGENASICA

$$K_0 = (k_7 k_9 k_{13} k_{15} + k_9 k_{13} k_{15} k_5 + k_{13} k_{15} k_5 k_7 + k_5 k_7 k_9 k_{14} + k_{15} k_5 k_7 k_9 + k_5 k_7 k_9 k_{13} + k_{13} k_{15} k_5 k_8) ;$$

$$v_{\text{máx}} = \frac{k_5 k_7 k_9 k_{13} k_{15}}{K_0} ; \quad K_A = \frac{k_7 k_9 k_{13} k_{15} k_2 (k_4 + k_5)}{k_1 k_3 K_0} ;$$

$$K_B = \frac{k_7 k_9 k_{13} k_{15} (k_4 + k_5)}{k_3 K_0} \quad \dagger \quad K_C = \frac{k_{27} k_7 k_9 k_{13} k_{15} (k_4 + k_5)}{k_{28} k_3 K_0}$$

$$\bar{K}_D = (k_{11} k_{13} k_{15} + k_1 k_{14} k_{12} + k_{15} k_1 k_{12} + k_{13} k_{15} k_1) ;$$

$$K_D = \frac{k_5 k_7 k_9 \bar{K}_D}{k_1 k_{11} K_0} ; \quad K_G = \frac{k_{33} k_5 k_7 k_9 (k_{14} k_{12} + k_{12} k_{15} \dagger \hat{K}_{13} k_{15})}{k_{34} k_{11} K_0} ;$$

$$K_E = \frac{k_{29} k_5 k_7 k_9 (k_4 + k_5)}{k_{30} K_0} ; \quad K_F = \frac{k_5 k_7 k_9 k_{31} (k_{14} + k_{15})}{k_{32} K_0} ;$$

$$K_H = \frac{k_7 k_9 k_2 k_{16} k_{14} k_{12} (k_4 + k_5)}{k_1 k_{11} k_3 K_0} ; \quad K_N = \frac{k_5 k_7 k_9 k_{16} k_{14} k_{31}}{k_1 k_{32} K_0} ;$$

$$K_I = \frac{k_7 k_9 k_{16} k_{14} k_{12} (k_3 k_5 + k_4 k_2 k_{33}/k_{34} + k_5 k_2 k_{33}/k_{34})}{k_1 k_{11} k_3 K_0} ;$$

$$K_J = \frac{k_5 k_7 k_9 k_{16} k_{14} k_{22} k_{23}}{k_1 k_{11} k_{34} K_0} ; \quad K_S = \frac{k_7 k_9 k_{13} k_{15} k_{21} (k_4 + k_5)}{k_3 k_{22} K_0} ;$$

$$K_K = \frac{k_7 k_9 k_2 k_{16} (k_4 k_{14} + k_5 k_{14} + k_{13} k_4 + k_5 k_{13})}{k_1 k_3 K_0}$$

.../...

$$\bar{K}_L = (k_{13}k_{15}k_1k_4k_{25}/k_{26} + k_5k_{13}k_{15}k_1k_{25}/k_{26} + k_4k_2k_{16}k_{14}k_{29}/k_{30} + k_5k_2k_{16}k_{14}k_{29}/k_{30}) ;$$

$$\bar{K}_M = (k_3k_5k_{14} + k_3k_5k_{13} + k_4k_2k_{14}k_{31}/k_{32} + k_5k_2k_{14}k_{31}/k_{32}) ;$$

$$K_P = \frac{k_5k_9k_7k_{16}k_{14}k_{29}/k_{30} + k_{13}k_{15}k_1k_9k_{23}/k_{24} + k_{13}k_{15}k_1k_8k_{23}/k_{24}}{k_1K_0} ;$$

$$K_Q = \frac{k_5k_{10}(k_7k_{14}k_{12} + k_7k_{15}k_{12} + k_7k_{13}k_{15} + k_{14}k_{12}k_8 + k_{15}k_{12}k_8 + k_{13}k_{15}k_8)}{k_{11}K_0} ;$$

$$K_R = \frac{k_5k_7k_9(k_{13}k_{19}/k_{20} + k_{14}k_{17}/k_{18} + k_{15}k_{17}/k_{18})}{K_0} ; \quad K_L = \frac{k_7k_9\bar{K}_L}{k_1k_3K_D} ;$$

$$K_T = \frac{k_2k_{16}k_{14}k_{12}k_{10}(k_7k_4 + k_7k_5 + k_8k_4 + k_8k_5)}{k_1k_{11}k_3K_{OZ}} ; \quad K_M = \frac{k_7k_9k_{16}\bar{K}_M}{k_1k_3K_0} ;$$

$$K_V = \frac{k_{16}k_{14}k_{12}k_{10}k_5(k_7 + k_8)}{k_1k_{11}K_0} ; \quad K_W = \frac{k_{16}k_{14}k_{12}k_{10}k_8k_5k_{23}}{k_1k_{11}k_{24}K_0} ;$$

$$\bar{K}_X = (k_{13}k_4k_{16}k_{19}/k_{20} + k_5k_{13}k_{16}k_{19}/k_{20} + k_4k_{16}k_{14}k_{17}/k_{18} + k_5k_{16}k_{14}k_{17}/k_{18}) ;$$

$$K_X = \frac{k_7k_9k_2\bar{K}_X}{k_1k_3K_D} ; \quad K_Y = \frac{k_2k_{16}k_{14}k_{10}k_8k_{23}(k_4 + k_5)}{k_1k_{11}k_3k_{24}K_0} ;$$

$$\bar{K}_Z = (k_1k_{14}k_{12}k_{10}k_8k_{23}/k_{24} + k_{15}k_1k_{12}k_{10}k_8k_{23}/k_{24} + k_{13}k_{15}k_1k_{10}k_8k_{23}/k_{24} + k_7k_9k_{11}k_{16}k_{13}k_{19}/k_{20} + k_7k_9k_{11}k_{16}k_{14}k_{17}/k_{18}) ; \quad K_Z = \frac{k_5\bar{K}_Z}{k_1k_{11}K_0}$$

$$\begin{aligned}
 1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} & \left[\frac{K_A}{AB^{1/2}} + \frac{K_B}{A} + \frac{K_C B^{1/2}}{A} + 1 + \frac{K_D}{B^{1/2}} + K_E B^{1/2} + K_F A + \right. \\
 & + \frac{K_G}{B^{1/2} A} + \frac{K_H Q^{1/2}}{AB} + \frac{K_I Q^{1/2}}{B} + \frac{K_J A Q^{1/2}}{B} + \frac{K_K Q^{1/2}}{AB^{1/2}} + \\
 & + \frac{K_L Q^{1/2}}{A} + \frac{K_M Q^{1/2}}{B^{1/2} Q^{1/2}} + \frac{K_N A Q^{1/2}}{B^{1/2} A Q^{1/2}} + K_P Q^{1/2} + \frac{K_Q}{B^{1/2} P} + K_R P + \\
 & + \frac{K_S P^{1/2}}{A} + \frac{K_T Q^{1/2} P}{AB} + \frac{K_V Q^{1/2} P}{B} + \frac{K_X Q^{1/2} P}{B^{1/2} Q^{1/2} P} + \frac{K_Z Q^{1/2} P}{B^{1/2} Q^{1/2} P} + \\
 & \left. + K_W \frac{PQ}{B} + K_Y \frac{PQ}{AB} \right]
 \end{aligned}$$

En el caso de que no haya exceso de ninguno de los sustratos y tampoco haya cantidades importantes de los productos, la expresión de $1/v$ se transforma en:

$$1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_A}{AB^{1/2}} + \frac{K_B}{A} + 1 + \frac{K_D}{B^{1/2}} \right)$$

Que se puede escribir en dos formas diferentes:

$$1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_A}{B^{1/2}} + K_B \right) \frac{1}{A} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_D}{B^{1/2}} + 1 \right)$$

ó bien :

$$1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_A}{A} + K_D \right) \frac{1}{B^{1/2}} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_B}{A} + 1 \right)$$

que se corresponden con las representaciones gráficas de las figuras 59 a, 62 a, 62 b, 63 a, 63 b, y 63 c.

Cuando hay exceso de sustrato A y no hay cantidades apreciables de los productos, la expresión de $1/v$ se transforma en :

$$1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_A}{A} + K_D + K_G A \right) \frac{1}{B^{1/2}} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_B}{A} + 1 + K_F A \right)$$

que corresponde al resultado de las figuras 64 b, 64 c, y 64 d.

En el caso de que haya exceso de sustrato B y no están presentes los productos de la reacción, la expresión de $1/v$ se transforma en:

$$1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_A}{B^{1/2}} + K_B + K_C B^{1/2} \right) \frac{1}{A} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_D}{B^{1/2}} + 1 + K_E B^{1/2} \right)$$

que corresponde con las representaciones en las figuras 65 a, 65 b y 65 c.

Al considerar el caso en que no haya exceso de ninguno de los sustratos, pero haya exceso de producto P, la expresión de $1/v$ queda como sigue:

$$1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_A}{AB^{1/2}} + \frac{K_B}{A} + 1 + \frac{K_D}{B^{1/2}} + \frac{K_Q P}{B^{1/2}} + K_R P + \frac{K_S P^{1/2}}{A} \right)$$

que se puede escribir en función de $1/A$:

$$1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_A}{B^{1/2}} + K_B + K_S P^{1/2} \right) \frac{1}{A} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_D}{B^{1/2}} + 1 + \frac{K_Q P}{B^{1/2}} + K_R P \right)$$

cuya representación gráfica corresponde a las figuras 66 a, 66b, 66 c, 67 a, 67 b, 67 c.

$$1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_A}{A} + K_D + K_Q \right) \frac{1}{B^{1/2}} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_B}{A} + 1 + K_R + \frac{K_S}{A} \right)$$

que corresponde a las representaciones de las figuras 68 b, 68 c, 68 d, 69 b, 69 c, y 69 d.

En el caso de que no haya exceso de ninguno de los dos sustratos, pero haya exceso de producto Q, la expresión de 1/v es:

$$1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_A}{AB^{1/2}} + \frac{K_B}{A} + 1 + \frac{K_D}{B^{1/2}} + \frac{K_H Q^{1/2}}{AB} + \frac{K_I Q^{1/2}}{B} + \frac{K_K}{AB^{1/2} Q^{1/2}} + \frac{K_L Q^{1/2}}{A} + \frac{K_M Q^{1/2}}{B^{1/2} Q^{1/2}} + K_P Q^{1/2} \right)$$

que se puede escribir en función de 1/A :

$$1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_A}{B^{1/2}} + K_B + \frac{K_H Q^{1/2}}{B} + \frac{K_K Q^{1/2}}{B^{1/2} Q^{1/2}} + K_L Q^{1/2} \right) \frac{1}{A} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(1 + \frac{K_D}{B^{1/2}} + \frac{K_I Q^{1/2}}{B} + \frac{K_M Q^{1/2}}{B^{1/2} Q^{1/2}} + K_P Q^{1/2} \right)$$

que corresponde a las figuras 70 a, 70 b, 70 c, 71 a, 71 b y 71 c.

Escribiéndola en función del sustrato B, la expresión queda como:

$$1/v = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_H Q^{1/2}}{A} + K_I Q^{1/2} \right) \frac{1}{B} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_A}{A} + K_D + \frac{K_K Q^{1/2}}{A} + \frac{K_M Q^{1/2}}{A} \right) \frac{1}{B^{1/2}} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \left(\frac{K_B}{A} + 1 + \frac{K_L Q^{1/2}}{A} + K_P Q^{1/2} \right)$$

cuya representación gráfica es la de las figuras 72 a, 72 b, 73 a y 73 b.

Así pues el mecanismo de reacción descrito anteriormente y los complejos que hemos supuesto han dado como resultado una ecuación de velocidad que explica los resultados experimentales obtenidos, pero hay que tener en cuenta que aunque la reacción estudiada últimamente :



es la que se da en mayor extensión, simultáneamente con ésta se dan la oxidásica y la diaforásica, aunque en una extensión mucho menor.

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

Para completar los estudios referentes al comportamiento ciné-
tico de la XDH en distintos sistemas, se procedió a estudiar
la reacción de oxidación de la hipoxantina a xantina, cuando
el enzima utiliza al ácido úrico como aceptor electrónico, el
cual se reduce a xantina.

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

Para caracterizar el sistema en estudio, se han determinado el
pH óptimo de actuación del enzima. El margen de pH en el cual
se determinaron las velocidades iniciales, estuvo comprendido
entre 5,7 y 3,0.

Puede observarse en la fig. 75 que el máximo de actividad se ha
lla situado alrededor de 6,0 y disminuye rápidamente a partir
de pH 6,5,,siendo despreciable a pH 7,0.

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

De acuerdo con los resultados expuestos en el apartado ante-
rior, las determinaciones de las velocidades iniciales, se
efectuaron en todos los casos a pH 6,0.

Las correspondientes representaciones gráficas de Lineweaver-
Burck correspondientes a inversas de hipoxantina y ácido úrico,
muestran líneas paralelas (fig. 76 a y 76 b), lo que demuestra

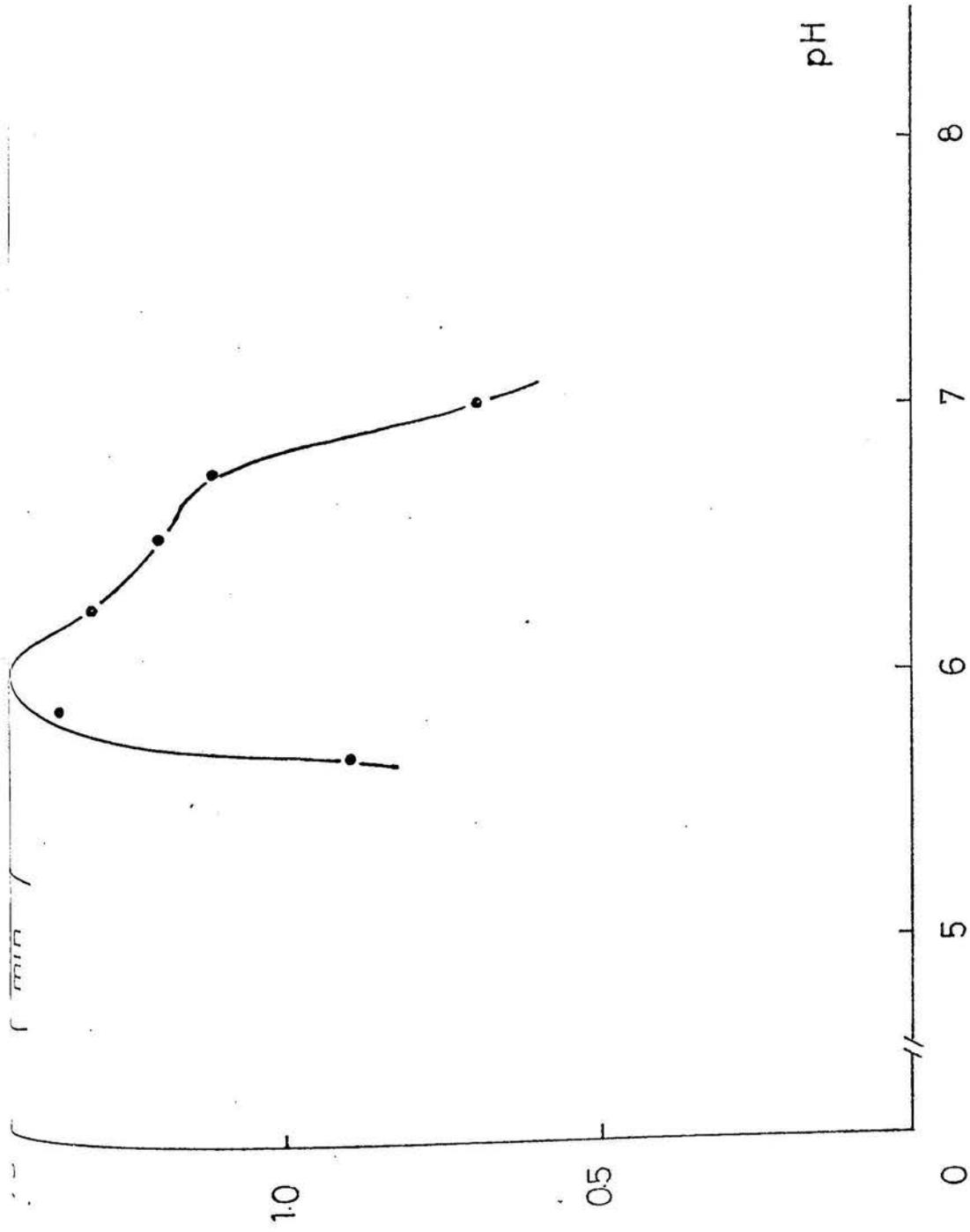


Fig. 75 pH óptimo del Sa HIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA
 Tampón tris-fosfato sódico 50 mM ; [XDH] = 32 U/ml ;
 [Hipoxantina] = 5×10^{-4} M ; [Ac.úrico] = 5×10^{-5} M

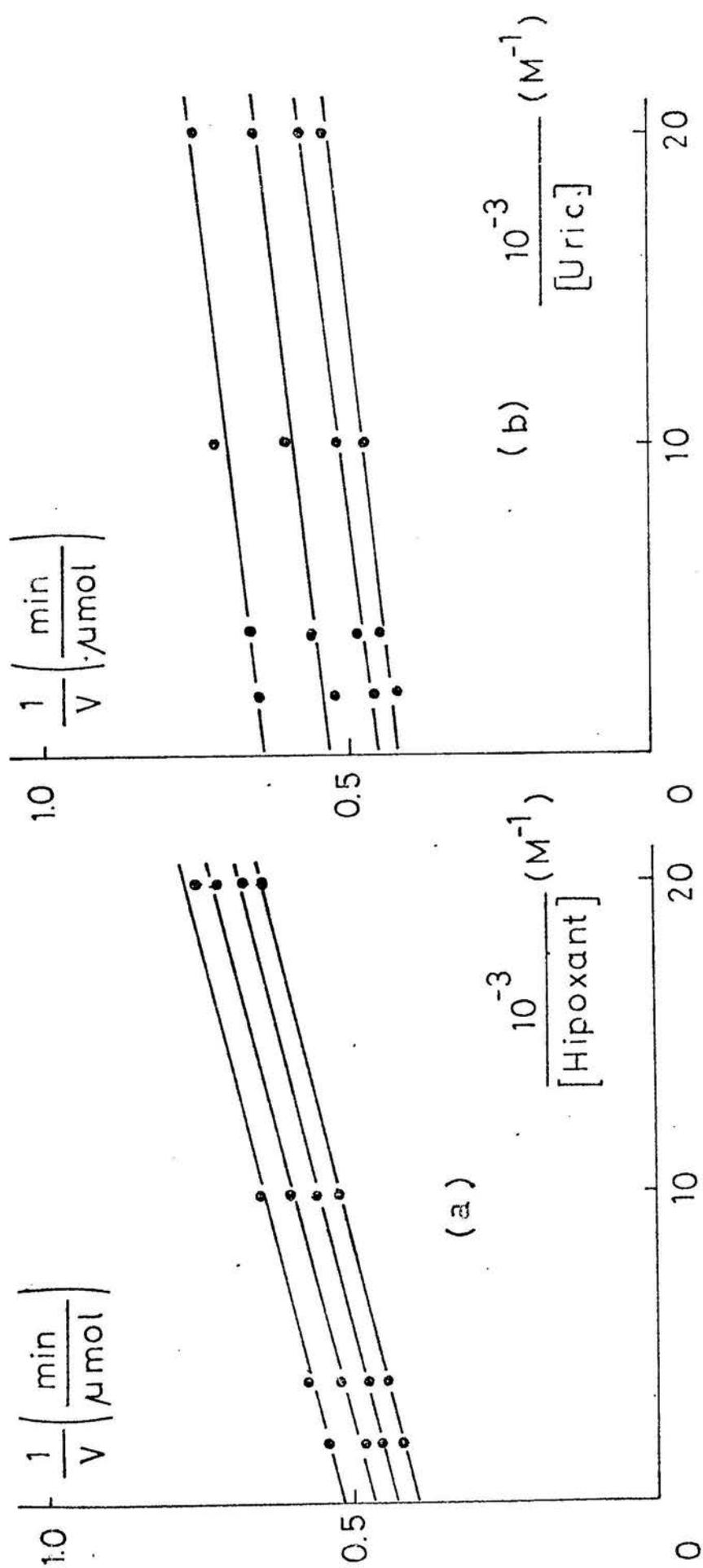


Fig. 76 Cálculo de los parámetros reales (Sa HIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA)

Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0 ; [XDH]= 32 U/ml

(a) Representación de Lineweaver-Burck respecto a la hipoxantina; De abajo a arriba:

[ác.úrico]x10⁵M⁻¹ = 5 ; 2,5 ; 1 ; 0,5

(b) Representación de Lineweaver-Burck respecto al ácido úrico ; De abajo a arriba:

[hipoxantina]x10⁴M⁻¹ = 5 ; 2,5 ; 1 ; 0,5

la ausencia de complejos ternarios y puede ser indicio de un mecanismo ping-pong.

A partir de los resultados de las fig. 76 a y 76 b, se efectuaron las correspondientes representaciones secundarias de Vestling-Florini, las cuales permiten la obtención de los parámetros reales del sistema (fig. 77).

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

Se ha procedido a determinar la inhibición que el exceso de ambos sustratos, la hipoxantina y el ácido úrico, ejercen sobre la XDH.

4.6.16.1 Inhibición por exceso de ácido úrico

El fenómeno de inhibición por exceso de sustrato aparece a partir de la concentración saturante de ácido úrico (5×10^{-5} M).

Se procedió a determinar cinéticamente la inhibición utilizando concentraciones de ácido úrico hasta $1,4 \times 10^{-4}$ M.

La representación de Lineweaver-Burck con respecto al sustrato variable (hipoxantina), es lineal, y la inhibición es de carácter acompetitivo (fig. 78 a). Sin embargo, al efectuar la representación de las intersecciones frente a la concentración de ácido úrico, aparecen desviaciones de la linealidad, que se adaptan a una parábola ó hipérbola cóncava (fig. 79 b); el mismo tipo de curvatura apareció en la correspondiente representación de Dixon (fig. 79 a).

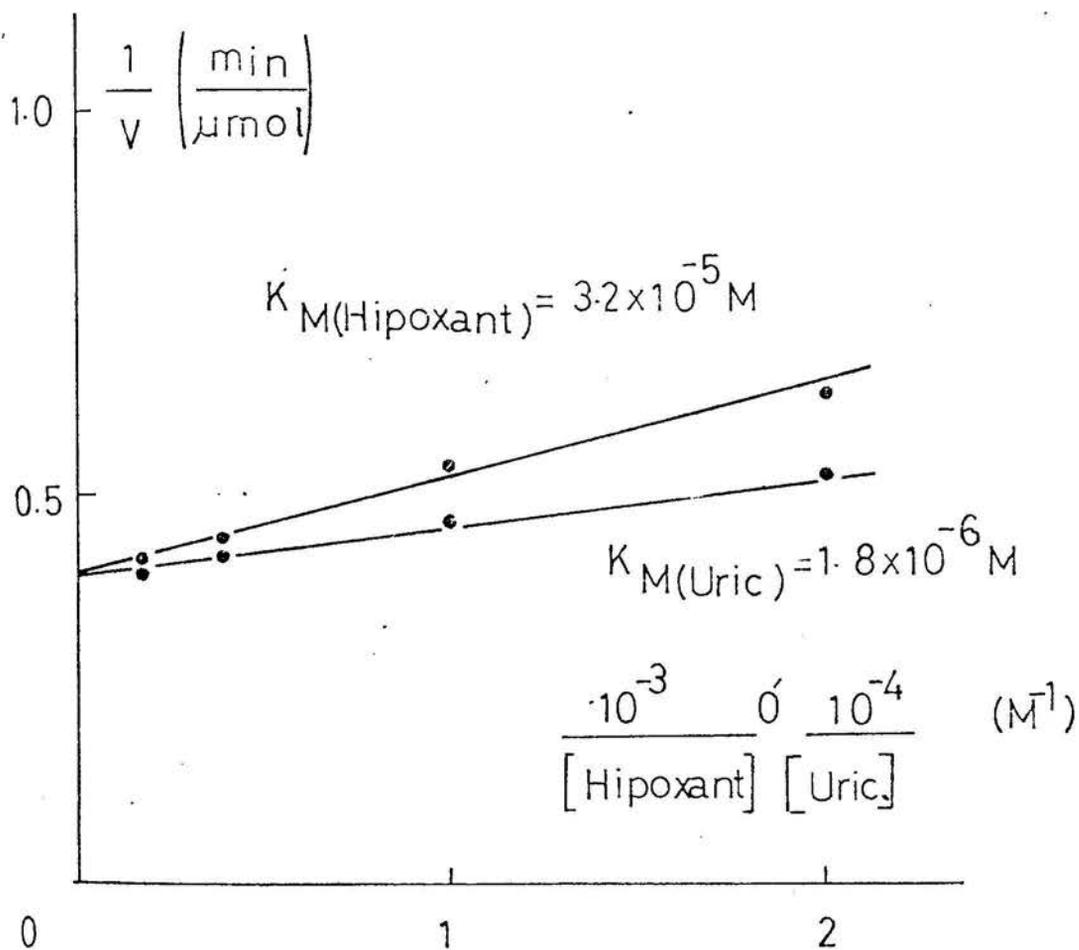


Fig. 77 Representaciones secundarias de Vestling-Florini correspondientes a la fig. 76
 De abajo a arriba: ác.úrico ; hipoxantina

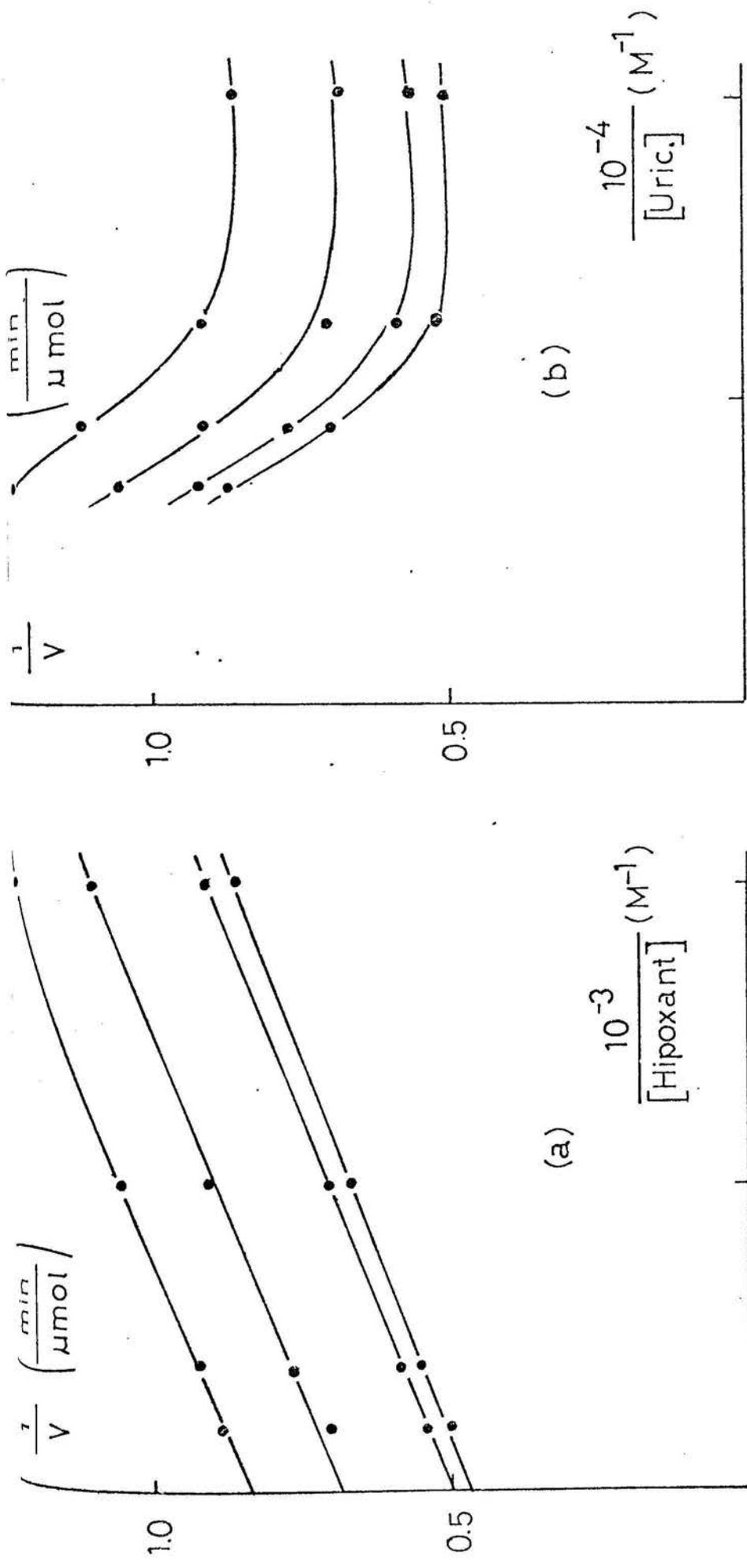


Fig. 78 Inhibición de la XDH por exceso de ácido úrico (Se HIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA)
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0 ; [XDH]= 32 U/ml

(a) Representación de Lineweaver-Burck respecto a la hipoxantina ;
 De abajo a arriba: [ác.úrico] x 10⁵ M⁻¹ = 5 ; 8 ; 11 ; 14

(b) Representación de Lineweaver-Burck respecto al ácido úrico ;
 De abajo a arriba: [hipoxantina] x 10⁴ M⁻¹ = 5 ; 2,5 ; 1 ; 0,5

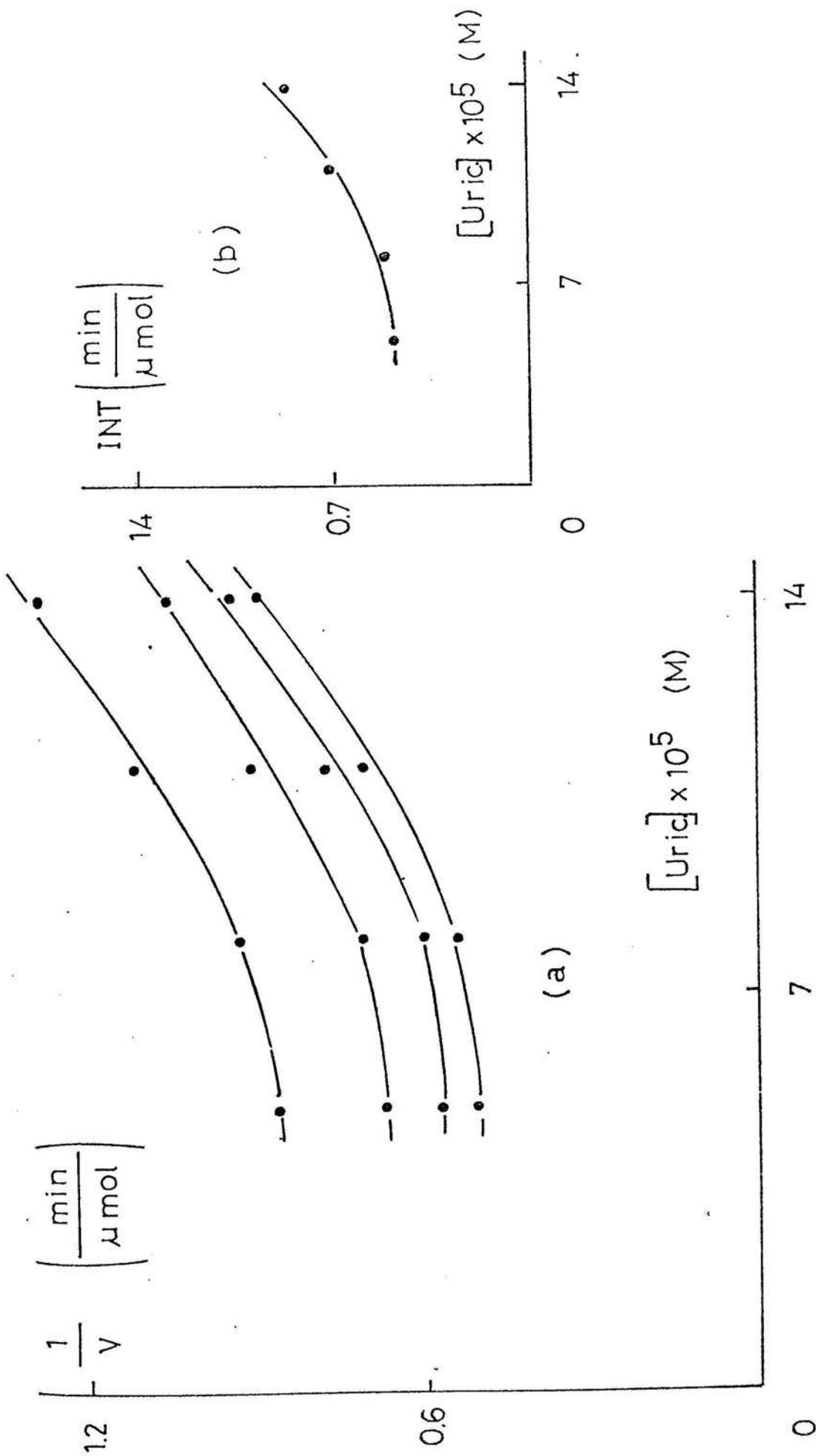


Fig. 79 (a) Representación secundaria de Dixon correspondiente a la fig. 78
 (b) Representación secundaria de intersecciones frente a [ác.úrico] correspondiente a la fig. 78 a

4.6.16.2 Inhibición por exceso de hipoxantina

La inhibición por exceso de sustrato aparece a partir de la concentración saturante de hipoxantina (5×10^{-4} M).

La determinación cinética del citado fenómeno se efectuó utilizando cantidades de hipoxantina de hasta 5×10^{-3} M.

La representación de Lineweaver-Burck con respecto al sustrato variable (ácido úrico) es lineal, y la inhibición es de tipo no competitivo mezclado (fig. 80 a). Sin embargo, al efectuar las representaciones secundarias de las intersecciones y de las pendientes, frente a [hipoxantina], se pudo apreciar un carácter no lineal hiperbólico (fig. 81 b). El mismo tipo de curvatura apareció al efectuar la correspondiente representación de Dixon (fig. 81 a).

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

Para completar el conocimiento cinético del mecanismo del sistema en estudio, se procedió a efectuar la determinación del carácter de la inhibición que sobre la XDH ejerce el producto de la reacción con respecto a ambos sustratos, considerando el otro sustrato fijo, a concentración tanto saturante como no saturante.

4.6.17.1 Inhibición con respecto al ácido úrico

a)- Concentración constante y no saturante de hipoxantina (1×10^{-4} M).

Las concentraciones de xantina utilizadas variaron entre 3×10^{-5} y 5×10^{-5} M.

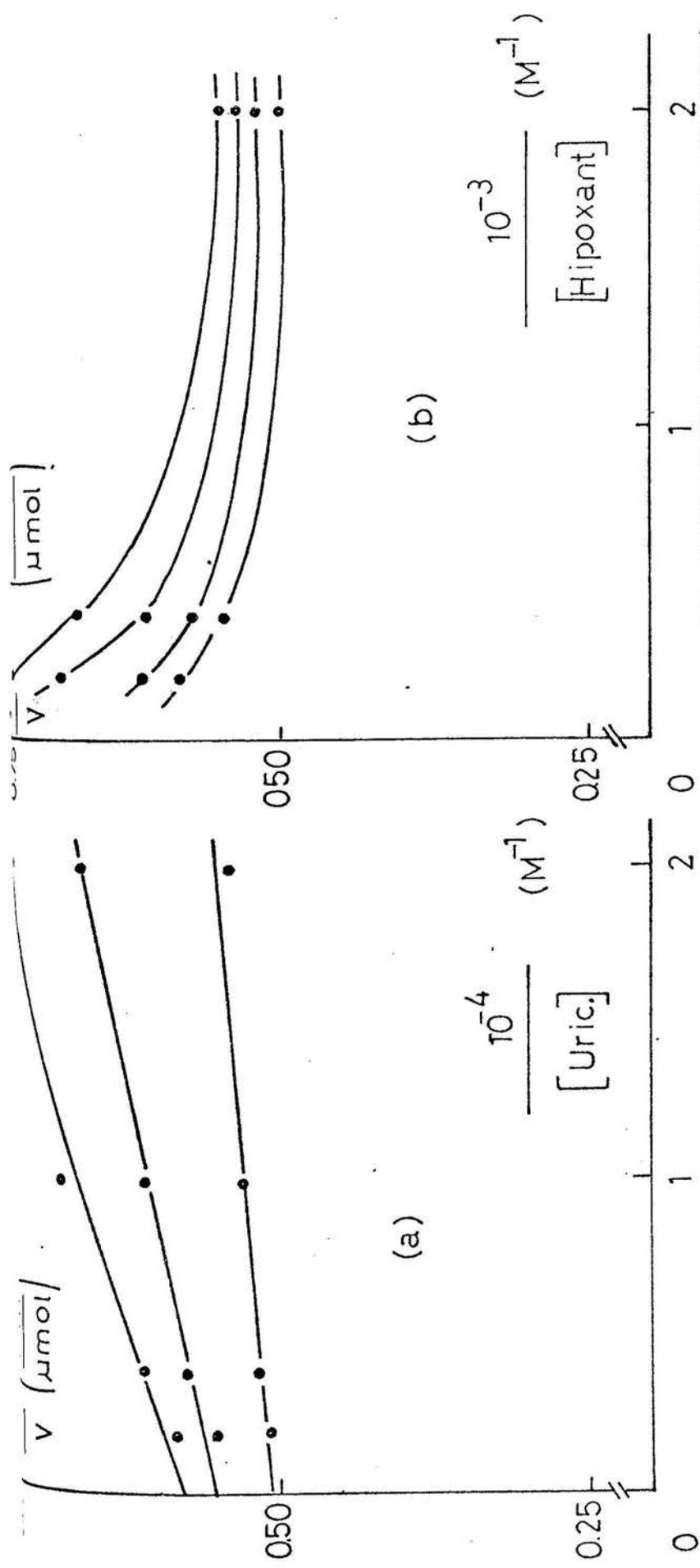


Fig. 80 Inhibición de la XDH por exceso de hipoxantina (Se HIPOXANTINA-AC. URICO-XDH-2XANTINA)

Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0 ; $[\text{XDH}] = 32 \text{ U/ml}$

(a) Representación de Lineweaver-Burck respecto al ácido úrico ;

De abajo a arriba: $[\text{hipoxantina}] \times 10^4 \text{ M}^{-1} = 5 ; 25 ; 50$

(b) Representación de Lineweaver-Burck respecto a la hipoxantina ;

De abajo a arriba: $[\text{ácido úrico}] \times 10^5 \text{ M}^{-1} = 5 ; 2,5 ; 1 ; 0,5$

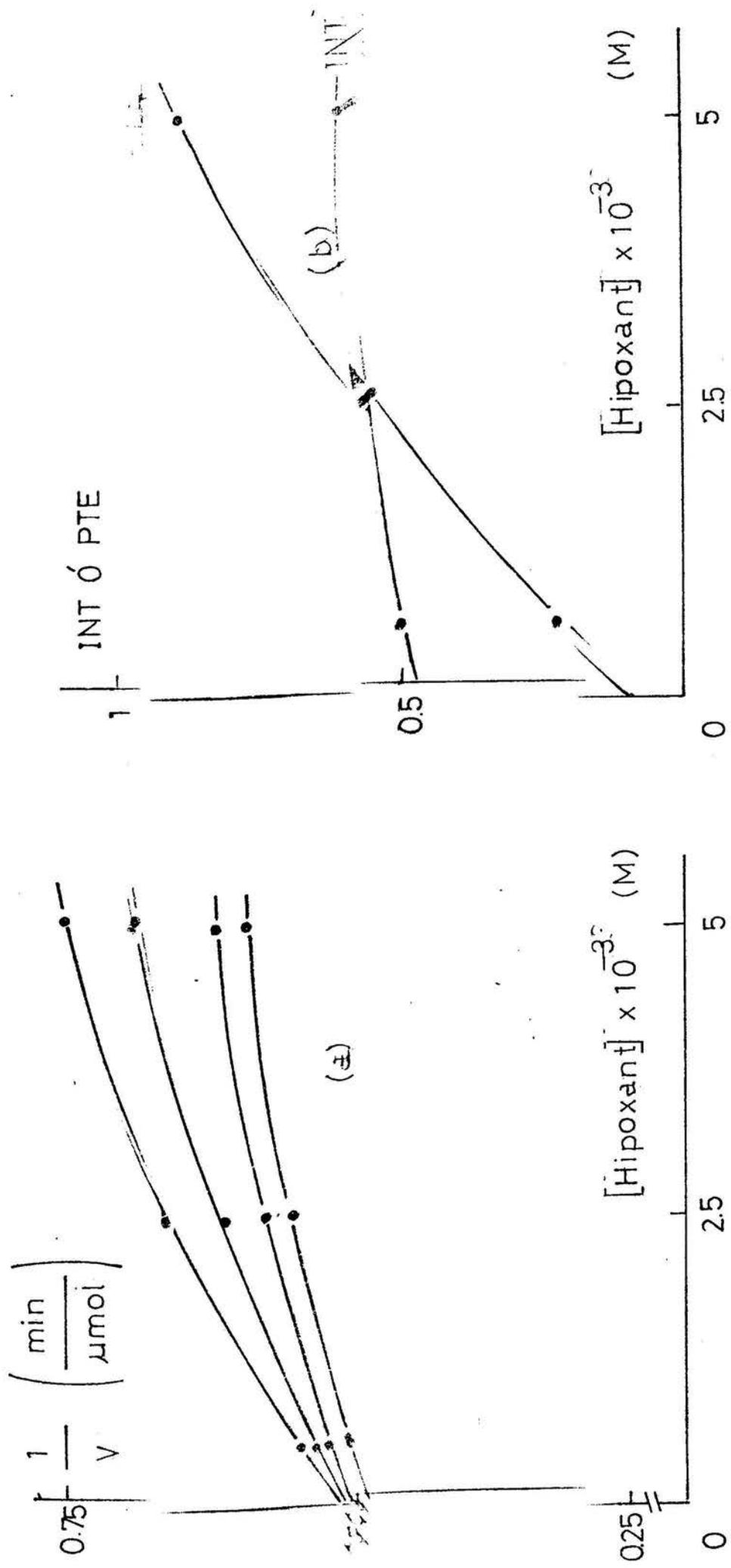


Fig. 81 (a) Representación secundaria de Dixon correspondiente a la fig. 80
 (b) Representación secundaria de intersecciones y pendientes frente a [hipoxantina] correspondiente a la fig. 80 a

La representación de Lineweaver-Burck y de Dixon (fig. 82 a y 82 b), condujeron a una inhibición de tipo no competitivo lineal.

La representación de las intersecciones y de las pendientes es lineal frente a $[xantina]$ (fig. 82 c).

b)- Concentración constante y saturante de hipoxantina (5×10^{-4} M).

Las concentraciones de xantina utilizadas como inhibidoras variaron entre 3×10^{-5} y 5×10^{-5} M.

En esta experiencia los resultados son análogos a los obtenidos con la concentración de hipoxantina no saturante, tal como puede apreciarse en las fig. 83 a, 83 b y 83 c.

4.6.17.2 Inhibición con respecto a la hipoxantina

a)- Concentración constante y no saturante de ácido úrico (1×10^{-5} M).

Las concentraciones de xantina utilizadas como inhibidoras variaron entre 5×10^{-6} y 5×10^{-5} M.

Las representaciones de Lineweaver-Burck y de Dixon (fig. 84 a y 84 b), condujeron a una inhibición de tipo no competitivo lineal.

La representación secundaria de las intersecciones y pendientes es lineal frente a la concentración de xantina (fig. 84 c).

b)- Concentración constante y saturante de ácido úrico (5×10^{-5} M).

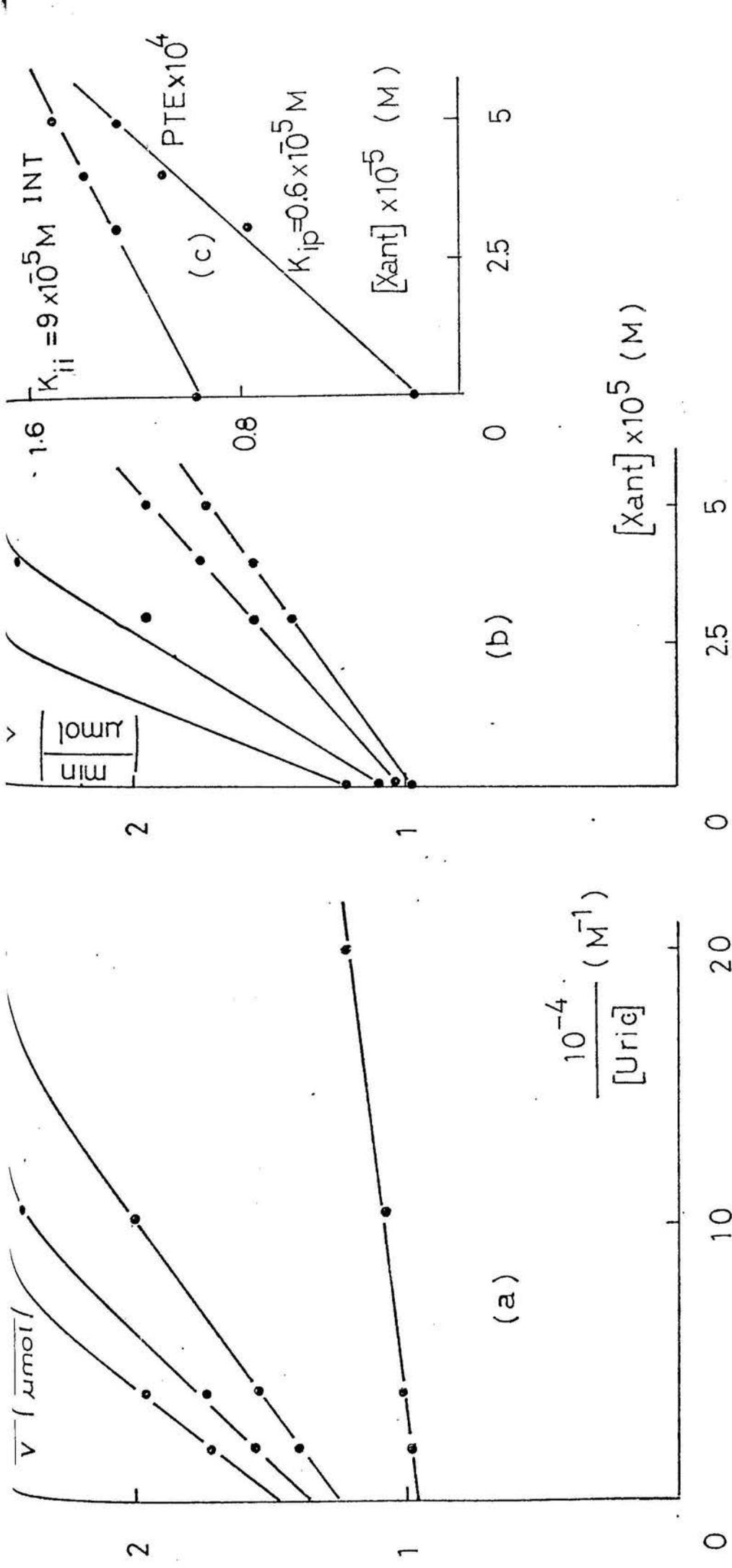


Fig. 82 Inhibición de la XDH por xantina (SAHIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA); [hipoxantina]_{no sat.} = $1 \times 10^{-4} M$
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0; [XDH]=32 U/ml; De abajo a arriba: [xantina] $\times 10^5 M^{-1}$ = 0;3;4;5
 (a) Representación de Lineweaver-Burck
 (b) Representación secundaria de Dixon
 (c) Representación secundaria de intersecciones y pendientes frente a [xantina]

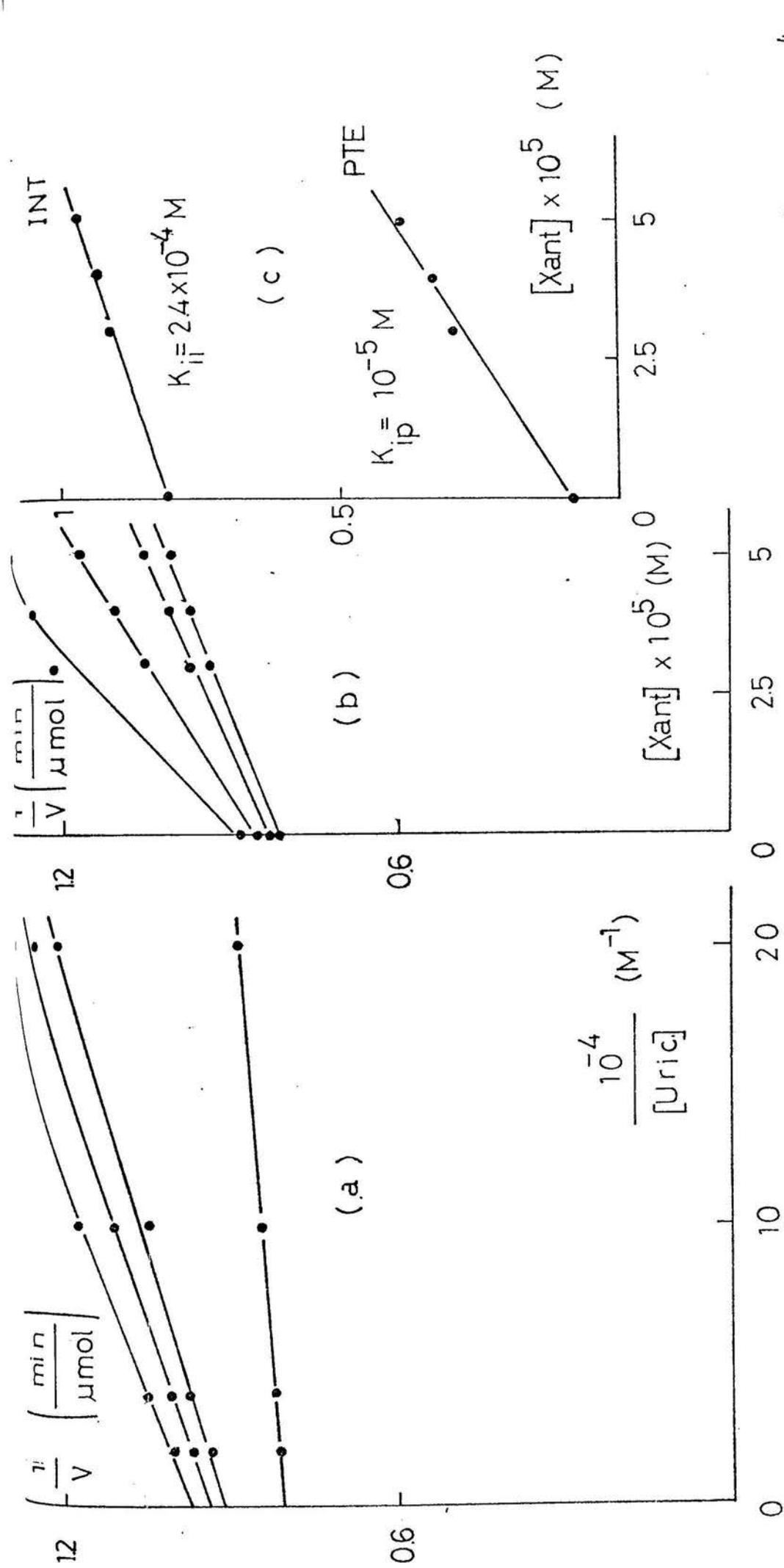


Fig. 83 Inhibición de la XDH por xantina (SAHIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA); $[\text{hipoxantina}]_{\text{sat.}} = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0 ; $[\text{XDH}] = 32 \text{ U/ml}$; De abajo a arriba: $[\text{xantina}] \times 10^5 \text{ M}^{-1} = 0; 3; 4; 5$

- (a) Representación de Lineweaver-Burck
- (b) Representación secundaria de Dixon
- (c) Representación secundaria de intersecciones y pendientes frente a $[\text{xantina}]$

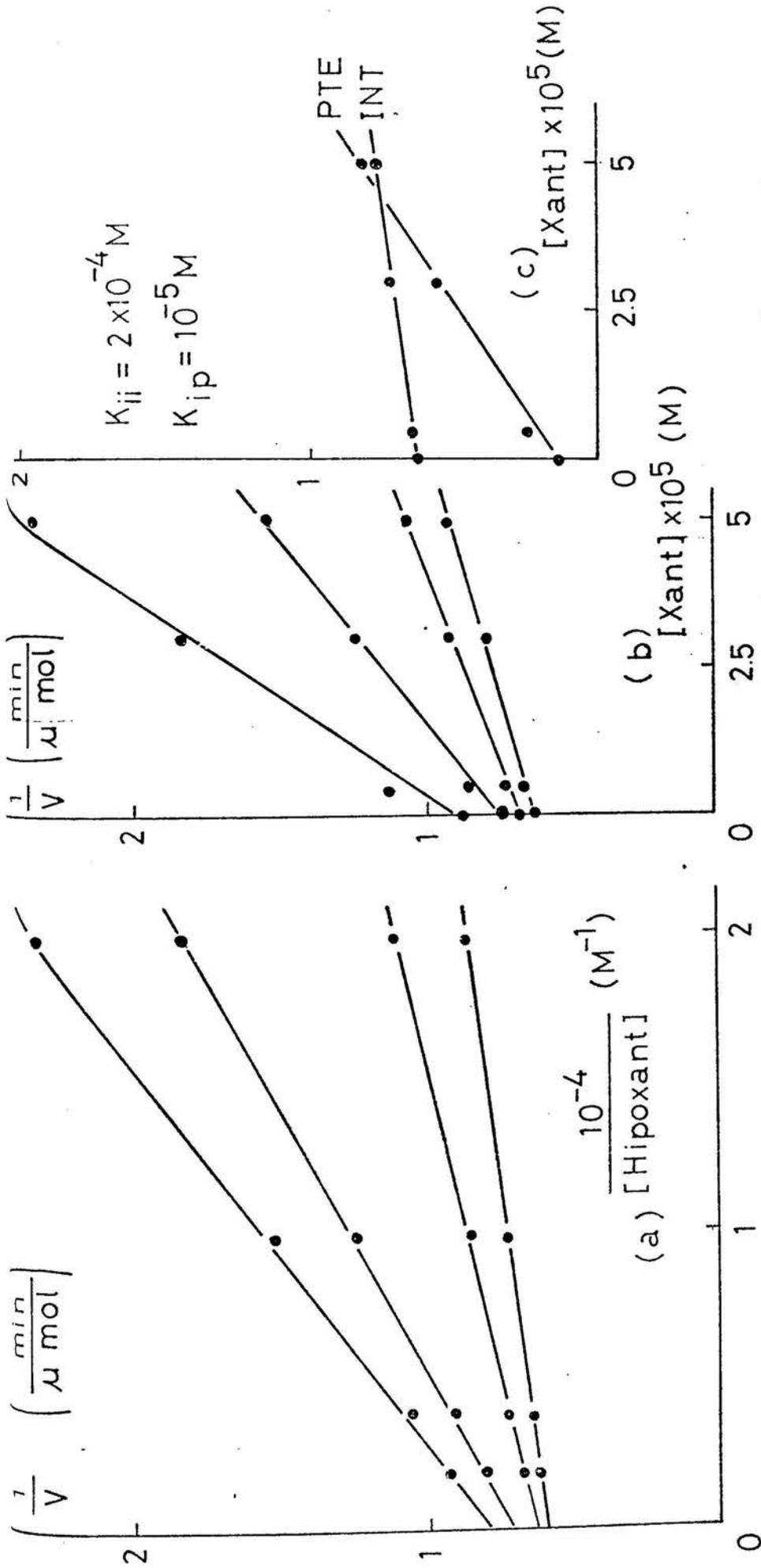


Fig. 84 Inhibición de la XDH por xantina (SAHIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA); $[\text{ác. úrico}]_{\text{no sat.}} = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0; $[\text{XDH}] = 32 \text{ U/ml}$; De abajo a arriba: $[\text{xantina}] \times 10^5 \text{ M}^{-1} = 0; 0,5; 3; 5$

(a) Representación de Lineweaver-Burck

(b) Representación secundaria de Dixon

(c) Representación secundaria de intersecciones y pendientes frente a $[\text{xantina}]$

Las concentraciones de xantina utilizadas como inhibidoras, variaron entre 5×10^{-6} y 5×10^{-5} M.

En esta experiencia los resultados fueron análogos a los obtenidos para el ácido úrico no saturante, como puede apreciarse en las figs. 85 a, 85 b y 85 c.

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

Utilizando los datos obtenidos en el estudio del presente sistema, se podría pensar en un mecanismo tal como el reflejado en la fig. 86.

Del esquema de reacción de la fig. 86, es posible deducir la ecuación de velocidad por el método de King y Altman (106) (107) De acuerdo con este método se llega a la ecuación siguiente:

$$v = \frac{(K_A + K_B U + K_C H) HU}{\text{denominador}}$$

siendo el valor del denominador:

$$K_D U + K_E U^2 + K_F H U^2 + K_G H U X + K_H H U + K_I H^2 U + K_J H X + K_K X + K_L H + K_M H^2 + K_N U X + K_O U^2 X$$

en el cual las distintas constantes poseen los valores que se indican en la tabla XXIII.

La expresión de $1/v$ que se obtiene a partir de la ecuación de velocidad, es la siguiente:

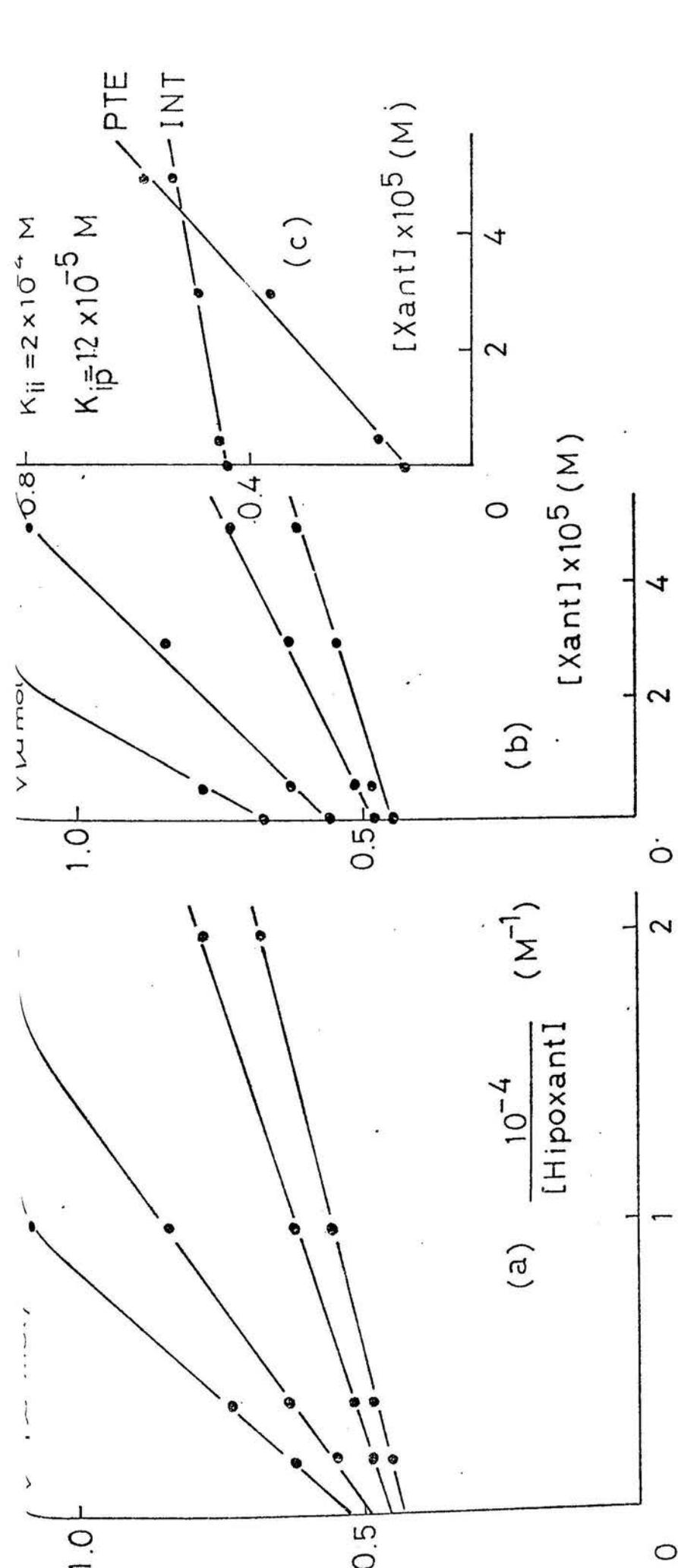


Fig. 85 Inhibición de la XDH por xantina (S=HIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2XANTINA); $[\text{ac. úrico}]_{\text{sat}} = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$
 Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0; $[\text{XDH}] = 32 \text{ U/ml}$; De abajo a arriba: $[\text{Xantina}] \times 10^5 \text{ M}^{-1} = 0; 0, 5; 3; 5$
 (a) Representación de Lineweaver-Burck
 (b) Representación secundaria de Dixon
 (c) Representación secundaria de intersecciones y pendientes frente a $[\text{xantina}]$

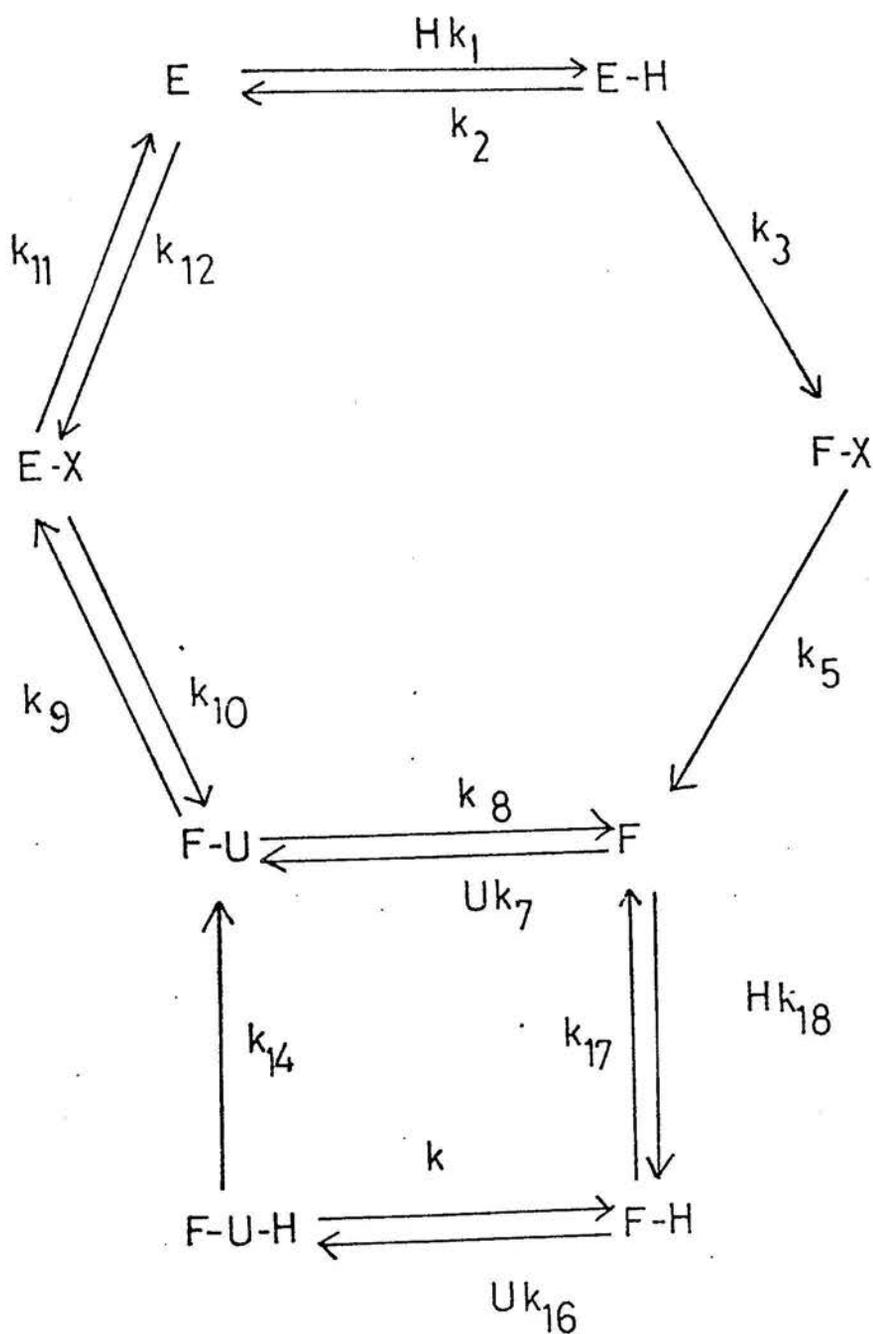


Fig. 86 Mecanismo reaccional de la XDH
 (Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0)
 H= hipoxantina; X= xantina; U= ác.úrico;
 E= XDH_{oxidada}; F= XDH_{reducida}

T A B L A XXIII

SIGNIFICACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE LA ECUACION DE VELOCIDAD DEL SISTEMA HIPOXANTINA-AC.URICO-XDH-2 XANTINA

$$K_A = k_1 k_3 k_5 k_7 k_9 k_{11} k_{17} (k_{14} + k_{15}) ; \quad K_B = k_1 k_3 k_5 k_7 k_9 k_{11} k_{14} k_{16} ;$$

$$K_C = k_1 k_3 k_5 k_7 k_9 k_{11} k_{14} k_{16} k_{18} ; \quad K_D = k_5 k_7 k_9 k_{11} k_{17} (k_2 + k_3) (k_{14} + k_{15}) ;$$

$$K_E = k_5 k_7 k_9 k_{11} k_{14} k_{16} (k_2 + k_3) ;$$

$$K_F = k_1 k_{14} k_{16} (k_3 k_5 k_7 k_9 + k_3 k_5 k_7 (k_{10} + k_{11}) + k_5 k_7 k_9 k_{11}) ;$$

$$K_G = k_5 k_{12} (k_2 + k_3) (k_{10} k_{14} k_{16} k_{18} + k_7 k_{10} k_{13} k_{17} + k_8 k_{10} k_{16} k_{18} + k_9 k_{14} k_{16} k_{18} + k_7 k_{10} k_{13} k_{15}) ;$$

$$K_H = k_1 k_7 k_{17} (k_{14} + k_{15}) [k_9 (k_5 k_{11} + k_3 k_{11} + k_3 k_5) + k_3 k_5 (k_{10} + k_{11}) + k_5 k_{14} k_{16} k_9 k_{11} k_{18} (k_2 + k_3) + k_1 k_3 (k_8 k_{10} + k_8 k_{11} + k_9 k_{11})] ;$$

$$K_I = k_1 k_{16} k_{18} [k_3 k_9 k_{11} k_{14} + k_3 k_5 k_{14} k_3 k_5 k_9 k_{14} + k_3 k_5 (k_8 k_{11} + k_8 k_{10} + k_9 k_{11}) + k_5 k_9 k_{11} k_{14}] ; \quad K_K = k_5 k_8 k_{10} k_{12} k_{17} (k_2 + k_3) (k_{14} + k_{15}) ;$$

$$K_J = k_5 k_{10} k_{12} (k_2 + k_3) (k_8 k_{14} k_{18} + k_8 k_{15} k_{18} + k_3 k_{15} k_{17})$$

$$K_L = k_1 k_3 k_5 k_{17} (k_8 k_{10} + k_8 k_{11} + k_9 k_{11}) (k_{14} + k_{15}) ;$$

$$K_M = k_1 k_3 k_5 k_{18} (k_8 k_{10} + k_8 k_{11} + k_9 k_{11}) (k_{14} + k_{15}) ;$$

$$K_N = k_5 k_{12} (k_2 + k_3) (k_8 k_{10} k_{14} k_{16} + k_7 k_{10} k_{14} k_{17} + k_7 k_{10} k_{15} k_{17} + k_7 k_9 k_{14} k_{17} + k_7 k_9 k_{15} k_{17}) ; \quad K_O = k_5 k_7 k_{12} k_{14} k_{16} (k_2 + k_3) (k_9 + k_{10}) .$$

$$1/v = \frac{\text{numerador}}{\text{denominador}}$$

siendo el numerador:

$$\frac{1}{K_H} \left[\frac{K_D}{H} + \frac{K_E U}{H} + K_F U + K_G X + \frac{K_J X}{U} + \frac{K_K X}{HU} + \frac{K_L}{U} + K_I H + \frac{K_M H}{U} + \frac{K_N X}{H} + \frac{K_O UX}{H} \right] + 1$$

y el denominador:

$$\frac{1}{K_H} (K_A + K_B U + K_C H)$$

En el caso de que no haya exceso de los dos sustratos ni del producto, la expresión de 1/v se reduce a:

$$1/v = \frac{K_L}{U K_H} + \frac{K_D}{H K_H} + 1 / \frac{K_A}{K_H}$$

la cual se puede escribir de dos formas distintas, según se refiera a inversas de las concentraciones de ácido úrico, o de hipoxantina. En ambos casos se observa que las representaciones de 1/v frente a las inversas de las concentraciones del correspondiente sustrato, dan lugar a rectas paralelas, lo que está de acuerdo con las fig. 76 y 77.

Quando se refiere la ecuación a las inversas de las concentraciones de hipoxantina, ~~pre~~ existe en el medio exceso de ácido úrico, que se comporta como inhibidor, la ecuación correspondiente se transforma en:

$$1/v = \left[\frac{1}{K_H} (K_D + K_E U) \frac{1}{H} + \left(1 + \frac{K_L}{U K_H} + \frac{K_F U}{K_H} \right) \right] \frac{K_A}{K_H} + \frac{K_B U}{K_H}$$

donde puede observarse, que la inhibición que ejerce el ácido úrico es no lineal y no competitiva. La no linealidad corresponderá a una hipérbola cóncava o convexa, según el valor de las constantes. En el presente sistema corresponde a una hipérbola cóncava, lo cual indica que se debe cumplir la relación siguiente:

$$\frac{K_B}{K_H} \left(\frac{K_E}{K_H} + K_F \right) > K_A \left(1 + \frac{K_D}{HK_H} \right)$$

Por otra parte, el hecho de que la inhibición hallada experimentalmente corresponda a una inhibición acompetitiva, debe indicar que el valor de K_E es poco significativo, lo que sugiere que $k_{14}k_{16}$ son de poca importancia y está de acuerdo con la fig. 79.

Cuando se refiere la ecuación a las inversas de la concentración de ácido úrico en presencia de exceso de hipoxantina, la ecuación queda como sigue:

$$1/v = \left(\frac{1}{K_H} (K_L + K_M) \frac{1}{U} + 1 + \frac{K_D}{HK_H} + \frac{K_{JH}}{K_H} \right) \left/ \left(\frac{K_A}{K_H} + \frac{K_{CH}}{K_H} \right) \right.$$

donde se puede observar que la inhibición que ejerce la hipoxantina con respecto al ácido úrico es de tipo no competitivo, de carácter no lineal hiperbólico, como puede apreciarse en la fig.

81. El hecho de que experimentalmente aparezca una hipérbola convexa indica que la relación

$$\frac{K_C}{K_H} \left(K_J + \frac{K_M}{U} \right) < K_A \left(1 + \frac{K_L}{UK_H} \right)$$

se cumple.

Por otra parte, cuando existe en el medio el producto de la reacción, la xantina, la ecuación que se obtiene considerando que ninguno de los sustratos se encuentra en exceso, es la si siguiente:

$$1/v = \left[1 + \frac{1}{K_H} \left(\frac{K_D}{H} + K_G X + \frac{K_J X}{U} + \frac{K_K X}{HU} + \frac{K_L}{U} + \frac{K_N X}{H} \right) \right] \frac{K_A}{K_H}$$

Puede observarse, que el efecto del producto con respecto a ambos sustratos es análogo, y se puede apreciar que es no competitivo lineal en todos los casos, lo cual está de acuerdo con los resultados experimentales (fig. 82, 83, 84 y 85).

5. DISCUSION

Para abordar el estudio comparativo de la XO y de la XDH, ha sido necesario partir de preparados de suficiente grado de pureza, y cuya actividad permitiese determinar los parámetros, objeto de la investigación.

La obtención de un preparado activo de XDH se ha efectuado por el método propuesto por GUBERT y col.(13), que proporciona un purificado enzimático con actividad adecuada para las determinaciones efectuadas en este trabajo. La obtención de preparados de XO con suficiente actividad específica, ha requerido un estudio cuidadoso ya que la bibliografía no describe ningún método de purificación adecuado para los fines del presente estudio.

El método de purificación de la XO que se propone, se funda en el método previamente descrito para la XDH (loc. cit.).

Se tuvo en cuenta en primer lugar la diferencia fundamental entre los tejidos hepáticos, de pollo y de buey, ya que sá bien el primero no posee uricasa, ésta se halla presente en el de procedencia bovina. La eliminación completa de la uricasa permite obtener valores de las velocidades iniciales que no resulten afectados por la eliminación del ácido úrico por el enzima, ya que aquél es el producto de la reacción que se determina espectrofotométricamente.

La eliminación de la uricasa se consigue mediante la homogeneización en sacarosa isotónica y posterior centrifugación a 15.000xg durante 1 h, con lo que se consigue la separación de las mitocondrias y de los peroxisomas, ya que en estos últimos reside la actividad uricásica.

La introducción de un tratamiento térmico resultó eficaz, como en la purificación de la XDH, pero si se efectúa con los homogeneizados en sacarosa, la separación de la proteína desnaturada del sobrenadante activo, después de la calefacción, se muestra difícil. Puede solucionarse el problema mediante la introducción anterior al tratamiento térmico de tampón de fosfato sódico 0,5 M de pH 7,4, en cantidad suficiente para que la concentración final en dicha sal sea 50 mM. Se consigue con ello que el residuo sólido de la centrifugación sea lo suficientemente compacto para poder efectuar una separación correcta de las dos fracciones producidas por la centrifugación.

El fraccionamiento salino con sulfato amónico, permite un preparado 40 veces más activo que el tejido hepático de partida.

En la consecución de un preparado más activo, resulta eficaz el empleo de una columna de DEAE-celulosa, de acuerdo con la técnica previamente descrita para la XDH (13). La aplicación posterior de una cromatografía en Sephadex G-200, da como resultado la obtención de un purificado de XO con una actividad específica 256 veces superior a la del tejido hepático de partida, y adecuado para las experiencias efectuadas en el presente trabajo.

El preparado se conserva activo a +4°C, de modo prácticamente indefinido.

Una vez establecido el método de purificación de la XO, se procedió a determinar de que forma afectan las variaciones de pH a los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$, tanto para este enzima como para la XDH.

En primer lugar, se estudió la variación en los sistemas que cataliza la XO. Cuando el sustrato utilizado fue la hipoxantina, se pusieron de manifiesto unos puntos de inflexión comunes para la variación de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m correspondientes a los valores

de pH 5,9 ; 8,3 y 9,2. Cuando el sustrato sobre el que actúa el enzima es la xantina, los valores resultaron ser de 6,2 ; 8 ; 8,4 y 9,2. Con las limitaciones del método se sugiere que puedan corresponder a los siguientes grupos ionizables: los situados alrededor de pH 6 a un grupo imidazol de la histidina, el de pH 8 al grupo oxo del sustrato xantina, los que corresponden a un valor de pH de 8,3 serían identificables con un grupo -SH, si bien posiblemente se puedan identificar con un grupo persulfuro que la bibliografía considera imprescindible para la unión enzima-sustrato, y su posterior conversión en el producto oxidado (32) (33) (48) (49), y por último el grupo ionizable a pH más básico se podría identificar con un ϵ -amino de la lisina.

Cuando el estudio tuvo lugar sobre la XDH, se determinaron igualmente los puntos de inflexión correspondientes a K_M y $V_{m\acute{a}x}$, para el sistema xantina-NAD⁺-XDH-ác.úrico-NADH. Se pusieron de manifiesto valores comunes para pK_M (xantina), pK_M (NAD⁺) y $\log V_{m\acute{a}x}$, correspondientes a los valores de pH 6,5 ; 7,5 y 8,5 que corresponden probablemente a un grupo imidazol de la histidina ; el que aparece a 6,5 , y el de 8,5 a un grupo persulfuro del centro activo del enzima, al igual que ocurría con la XO. Sin embargo, el que se presenta a pH 7,5 resulta de más difícil asignación. Además de los puntos de inflexión comunes, cuando se trata del pK_M (xantina) aparece otro punto de inflexión a pH 8,0 , el cual se asignó al grupo oxo de la xantina.

Asimismo se efectuaron análogas determinaciones para el sistema xantina-O₂-XDH-ác.úrico- H₂O₂, apareciendo en este caso unos puntos de inflexión que se asignaron al grupo imidazol de la histidina, al grupo oxo de la xantina y a un grupo persulfuro en el centro activo del enzima.

Ponen de manifiesto los resultados analizados, que en todos los sistemas estudiados existen dos valores de pK comunes, que, tal como se ha indicado, se sugiere corresponden al grupo imidazol de la histidina y al grupo persulfuro presente en el centro catalítico del enzima.

Se ha tratado de confirmar la presencia de grupos -SH y su intervención en la actividad de la XO y de la XDH, mediante el estudio de las acciones que producen algunos de los reactivos de grupos -SH más característicos, sobre los mencionados enzimas.

El efecto que el PCMB, DTNB, NEM y IAM ejercen sobre la XO es variable, al igual que ocurre sobre las actividades oxidásica y deshidrogenásica de la XDH. En primer lugar, se puso de manifiesto que el PCMB inhibe a ambos enzimas de modo irreversible en las condiciones en que se ha experimentado ; la inhibición no es progresiva con el tiempo de contacto y si bien se anula por la presencia del 2ME y por diálisis.

Al valorar los grupos -SH con PCMB, se pone de manifiesto que el reactivo no reacciona con la XO en ausencia del sustrato xantina. Si se considera que el enzima es fuertemente inhibido por el reactivo, y que se postula que existe un grupo persulfuro en el centro activo del enzima (32) (33) (48) (49), parece probable que dicho grupo se halle estabilizado de tal forma, que sea inasequible para el PCMB en ausencia del sustrato de la reacción.

El DTNB no altera la actividad vatalítica de la XO y de la XDH.

Por su parte, la NEM y la IAM inhiben la actividad oxidásica de ambos enzimas, pero no afectan a la actividad deshidrogenásica de la XDH. La inhibición provocada por ambos reactivos es reversible y de carácter competitivo hiperbólico para la NEM, y acompetitivo hiperbólico para la IAM, en ambos casos con respecto a la xantina.

El que la NEM y la IAM resulten incapaces de interaccionar con el enzima de hígado de pollo, cuando el NAD^+ es el acep-tor electrónico, sugiere que éste modifica la molécula de XDH

e impide tal interacción, o bien ejerce un efecto protector.

Al considerar el hecho de que la NEM inhibe la reacción oxidásica competitivamente con respecto al sustrato, se pone de manifiesto que el efecto no puede ser de proteger el centro al que se une el reactivo, dado que el sustrato y el aceptor electrónico no compiten por el mismo centro † sin embargo, ello resulta posible en el caso de la IAM, que probablemente interacciona con la flavina alquilándola.

Para explicar estas anomalías, es preciso suponer que el NAD^+ interacciona con el enzima anteriormente a que lo haga la xantina, si bien este hecho estaría en contradicción con el mecanismo ping-pong, que se supone para el enzima, ya que se ha podido aislar la forma reducida del enzima después de reaccionar con la xantina y liberar ácido úrico en ausencia del aceptor electrónico. Este hecho encuentra una explicación cinética adecuada, como puede verse en 4.6.12.

Es también importante destacar, que en la XDH aparece un grupo ionizable a pH 7,5 cuando el NAD^+ se encuentra en el medio y que este grupo, de difícil asignación, pudiera ser el responsable de la actividad deshidrogenásica, y su ausencia es la causa que la XO carezca de tal actividad.

Esta hipótesis, llevó a pensar en la posibilidad de inducir la actividad deshidrogenásica en el enzima de procedencia flavina. Se ha descrito el fenómeno (52) (53) (54) (55) (56) (57) en la xantindeshidrogenasa de hígado de rata y humano ; ambos enzimas se comportan inicialmente como deshidrogenasas y el proceso de extracción del enzima incrementa la capacidad oxidásica en detrimento de la deshidrogenásica. Determinados tratamientos sobre la oxidasa así formada, provocan la recuperación de la actividad deshidrogenásica ; cuando se trata con reductores ocurre tal transformación, que se supone pudiera estar relacionada con la aparición de grupos -SH.

Si bien la XO es capaz de interaccionar con el NAD^+ , esta interacción no conduce a la reoxidación del enzima reducido, al oxidar la xantina a ácido úrico. Es asimismo conocido el hecho de que tanto el oxígeno como el NAD^+ se únen al mismo locus del enzima, por lo que algunos autores han supuesto que la transformación es probablemente aditiva (51).

De acuerdo con estas hipótesis, se ensayaron diferentes tratamientos. La incubación de XO con 2ME y con NaHSO_3 no induce actividad deshidrogenásica en el enzima. Tampoco produce resultados positivos la preparación de la XO en presencia de 2ME.

El DTE y su isómero el DTT, inducen la aparición de actividades deshidrogenásica en la XO. Las condiciones óptimas que dan lugar a la aparición del máximo de la actividad deshidrogenásica provocan, a su vez, un descenso de la actividad oxidásica, pero el incremento de la actividad deshidrogenásica no es equivalente al descenso de la actividad oxidásica. Se puso asimismo de manifiesto que la eliminación por diálisis del reactivo inductor de la actividad deshidrogenásica no provoca la pérdida de la actividad inducida en el enzima.

Al determinar los parámetros cinéticos para la xantina y ~~los~~ NAD^+ en la reacción deshidrogenásica en la XO, las representaciones cinéticas ponen de manifiesto la ausencia de complejos cinéticos ternarios, lo que probablemente es debido a que el mecanismo de la reacción es de tipo ping-pong.

Una vez estudiada la posibilidad de obtener actividad deshidrogenásica a partir de una oxidasa característica, se trató de inducir actividad oxidásica en la XDH, que es predominantemente una deshidrogenasa. Para esta transformación, se utilizaron métodos de digestión proteolítica, que se habían mostrado adecuados para obtener una oxidasa no convertible en deshidrogenasa en la xantindeshidrogenasa de hígado de rata (52) (53) (54) (55) (56) (57).

La acción de la tripsina, la α -quimotripsina y la subtilisina no provocan ningún cambio en la relación de las actividades oxidásica y deshidrogenásica de la XDH, así como tampoco modifican los valores absolutos de dichas actividades catalíticas.

La caracterización cinética de la XO y de la XDH ha permitido completar el conocimiento de sus analogías y diferencias más importantes.

El pH óptimo de la XO, cuando cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina, o de ésta a ácido úrico es de 8,4. En la determinación de K_M (xantina), al representar las inversas de las velocidades iniciales frente a las inversas de la concentración de xantina, la representación no es lineal. Por otra parte, la representación de Hill proporciona una recta cuya pendiente es $1/2$. Se creyó oportuno, por ello, representar $1/v$ frente a $1/[xantina]^{1/2}$ con lo que, aparece una línea recta; ello implica que la ecuación de velocidad se adapta a:

$$v = \frac{v_{\text{máx}} S^{1/2}}{K_1 + S^{1/2}}$$

La xantina (10^{-3} M) no produce inhibición por exceso de sustrato. El producto de la reacción, el ácido úrico, provoca inhibición y se observa que en la representación de Lineweaver-Burck aparece una curvatura que es idéntica a la obtenida en su ausencia. Por otra parte, al representar $1/v$ frente a $1/[xantina]^{1/2}$, se deduce que la inhibición es de tipo no competitivo. La representación de $1/v$ frente a $[\text{ác.úrico}]^{1/2}$ es lineal; también la representación de las intersecciones y de las pendientes son lineales frente a $[\text{ác.úrico}]^{1/2}$. La ecuación que corresponde a tal comportamiento es

$$v = \frac{v_{\text{máx}} S^{1/2}}{(K_1 + S^{1/2}) (1 + PK'_2)}$$

Con objeto de comparar el comportamiento cinético de la XDH y de la XO, se ha determinado la acción que el NADH ejerce sobre este último enzima. La presencia del NADH no altera la linealidad de la representación de $1/v$ frente a $1/[xantina]^{1/2}$ y la inhibición que se produce es de tipo acompetitivo. Por otra parte, la representación de las intersecciones frente a distintas potencias de la concentración de NADH, se desvían de la linealidad. Sin embargo, la curva cambia de cóncava a convexa, según si la representación se efectúa frente a la concentración de NADH o a $[NADH]^{1/2}$; ello indica que el término que afecta a las intersecciones será, probablemente:

$$1 + K_3 [NADH]^{1/2} + K_4 [NADH]$$

En el estudio del comportamiento cinético frente a la hipoxantina, la representación de Lineweaver-Burck no es lineal, pero sí lo es la de $1/v$ frente a $1/[hipoxantina]^{1/2}$. La hipoxantina provoca inhibición por exceso de sustrato y la representación de $1/v$ frente a $[hipoxantina]^{1/2}$ es lineal. Estos resultados conducen a formular la hipótesis de que la ecuación de velocidad es:

$$v = \frac{V_{\text{máx}} S^{1/2}}{K_5 + S^{1/2} + K_6 S}$$

El ácido úrico es inhibidor no competitivo con respecto a la hipoxantina, en analogía a lo observado con la xantina. La representación de $1/v$ frente a la concentración de ácido úrico o a $[ác.úrico]^{1/2}$ no es lineal; lo mismo ocurre en la representación de las intersecciones. Sin embargo, la representación de las pendientes frente a $[ác.úrico]^{1/2}$ es lineal. En este caso, no aparece la misma linealidad que con respecto a la xantina, en la que todas las representaciones se adaptan a la linealidad frente a $[ác.úrico]^{1/2}$. La ecuación de velocidad que explica estos resultados es:

$$v = \frac{v_{\text{máx}} S^{1/2}}{(1 + P^{1/2} K'_7) K_5 + S^{1/2} (1 + P^{1/2} K'_8 + PK'_9 + P^{3/2} K'_{10})}$$

La XO cataliza la reacción diaforásica, de oxidación del NADH a NAD⁺. La reacción se siguió a pH 6,0 ya que a su pH óptimo que es inferior, tanto en enzima como el NADH se alteran. En este caso, la representación de Lineweaver-Burck no es lineal y no aparece inhibición por exceso de sustrato. Al igual que con la hipoxantina y la xantina, la representación de 1/v frente a 1/[NADH]^{1/2} es lineal, siendo la ecuación de velocidad análoga a las anteriores. La inhibición por producto, NAD⁺, es de tipo competitivo y la representación frente a [NAD⁺]^{1/2} es lineal, lo que se halla de acuerdo con la ecuación de velocidad:

$$v = \frac{v_{\text{máx}} S^{1/2}}{K_{11} (1 + K'_{12} P^{1/2}) + S^{1/2}}$$

La inhibición que ejerce el ácido úrico sobre la XO con respecto al NADH es de tipo incompetitivo ; siendo no lineal con respecto a [ác.úrico]^{1/2}, [ác. úrico] y [ác.úrico]². Posiblemente la ecuación de velocidad que explica estos resultados corresponda a:

$$v = \frac{v_{\text{máx}} S^{1/2}}{K_{11} + S^{1/2} (1 + K'_{13} U^{1/2} + K'_{14} U + K'_{15} U^{3/2})}$$

El comportamiento cinético de la XO se resume en la tabla XXIV.

La aparición en todos los casos de linealidad al representar 1/v frente a las inversas de la concentración de sustrato elevada a 1/2, induce a pensar que la reacción se adapte a un orden de 1/2. Este hecho junto con que la XO es un enzima que consta de dos hemimoléculas con un centro activo cada una, con

RESUMEN DE LOS RESULTADOS CINETICOS DE LA XO

SUSTRATO	LINEALIDAD 1/S	INHIBICION SUSTRATO LINEALIDAD S	INHIBICION AC.URICO	INHIBICION NADH	INHIBICION NAD ⁺
Xantina	1/2	NO	NC LINEAL 1/2	AC. NO LINEAL	
Hipoxantina	1/2	1/2	NC PTE. LINEAL 1/2 INT. NO LINEAL		
NADH	1/2	NO	AC NO LINEAL		C LINEAL 1/2

duce a postular la hipótesis de que solo una molécula de sustrato se une a un centro activo de la XO indistintamente. Si esta unión provoca la anulación de la capacidad catalítica del otro centro activo libre, resultará que por cada centro activo del enzima corresponderá estequiométricamente $1/2$ molécula del sustrato.

Una confirmación de esta hipótesis se encuentra en el hecho de que la inhibición por hipoxantina es lineal con respecto a $[Hipopoxantina]^{1/2}$, lo cual indica que ambos centros se saturan para dar un complejo inactivo, en el cual la estequiometría E-S será 1:1. Por otra parte, el que cuando el sustrato es la xantina o bien el NADH, no se alcance la concentración saturante, puede interpretarse por la escasa solubilidad de la xantina y la elevada densidad óptica del NADH, que no permite trabajar con concentraciones muy elevadas.

En todos los casos la inhibición puede explicarse por la fijación del inhibidor a su centro característico, o bien al segundo centro presente en la molécula enzimática.

La interpretación de las representaciones gráficas obtenidas con la XO, ha conducido a la formulación de las diferentes ecuaciones de velocidad, que explican satisfactoriamente los valores de las velocidades de reacción oxidásica y diaforásica, así como las inhibiciones por hipoxantina, por ácido úrico y por NAD^+ y NADH.

Las condiciones en que se han efectuado las experiencias, concentración constante de oxígeno, y el hecho de que la xantina sea también sustrato de la reacción, no permiten el llegar a formular un mecanismo general de reacción.

Los datos obtenidos pueden permitir no obstante, vislumbrar ciertas analogías o diferencias entre la oxidasa en estudio y la deshidrogenasa de hígado de pollo, cuyo mecanismo cinético general, se discute más adelante.

En el estudio del mecanismo de reacción de la XDH, se han abordado tres de las reacciones de oxidación que cataliza el enzima, las cuales son : la reacción diaforásica (de oxidación del NADH), la reacción oxidásica y la oxidación de la xantina ; utilizan el oxígeno las dos primeras y la tercera el NAD^+ como acceptor electrónico respectivamente. En ellas el enzima está como deshidrogenasa.

En el estudio de la reacción diaforásica, al igual que ocurre con la XO, al representar los valores de $1/v$ frente a $1/[\text{NADH}]$, se obtienen líneas curvas ; aparentemente una parábola ó una hipérbola convexa.

La dificultad de obtener resultados, a partir de una representación no lineal, ha obligado a plantear dos soluciones posibles para resolver el problema.

Se puede intentar deducir un tipo de representación, en la que se obtenga linealidad, tal como se había efectuado con la XO.

Otra posibilidad es el intentar ajustar la curva a una ecuación teórica, previamente escogida para poder deducir así analíticamente los valores de las constantes cinéticas.

Por otra parte, las representaciones de Hill, para las experiencias realizadas con la reacción diaforásica, son lineales ; la pendiente de las rectas es aproximadamente $1/2$. En correlación con lo observado, con la XO, puede aceptarse que en la ecuación de la velocidad, el coeficiente que afecta al sustrato es $1/2$. Efectivamente, la representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NADH}]^{1/2}$ es lineal.

Los resultados comentados implican que la estequiometría de la reacción, es tal, que media molécula de NADH se une a cada centro activo del enzima. La conclusión, aparentemente ilógica, puede encontrar su explicación si se tiene en cuenta que las moléculas de XO y de XDH, están constituidas por dos hemimolé

culas, cuya estructura y funcionalidad se supone que son idénticas, y que cada una de ellas posee un centro activo al que se le unirá una molécula de NADH por cada molécula de enzima, pero la fijación de la molécula del sustrato debe implicar obligatoriamente que el otro centro resulte inasequible para otra molécula de NADH. Ante esta hipótesis debe preguntarse cuál es el papel que desempeñan los dos centros que posee la molécula del enzima si solamente uno de ellos es capaz de mostrar actividad catalítica. Se puede afirmar que al tener dos centros activos por molécula, la posibilidad de captar una molécula del sustrato, NADH es mayor, aunque la fijación de éste provoque la pérdida de la capacidad catalítica del otro centro activo.

Por otra parte, parece probable que el mecanismo cinético sea ping-pong, ya que se ha aislado el enzima reducido, una vez se ha liberado el primer producto de la reacción (32) (33) (48) (49). La forma enzimática reducida es independiente del sustrato utilizado para la reacción. En el establecimiento del mecanismo de la reacción diaforásica, la transformación de NADH a NAD^+ se ha considerado que es reversible puesto que el NADH a la vez que es sustrato de la reacción diaforásica, es también producto de la reacción deshidrogenásica, en la que el NAD^+ actúa como aceptor electrónico.

La inhibición de la XDH por exceso de NADH es incompetitiva, mientras que la XO no era inhibida; estos resultados indican que el NADH es capaz de fijarse a distintas formas enzimáticas para dar lugar a la formación de complejos abortivos. Se sugiere la existencia de uno, cuya estequiometría sea E-NADH, lo cual indica que en presencia de exceso de sustrato no sea uno solo de los centros el que capte una molécula de NADH; sin embargo, el complejo así formado deberá ser inactivo y así se comporta en el intervalo de concentraciones de NADH con más que se experimenta. Es decir, ambos centros del enzima quedan bloqueados catalíticamente al saturarse con NADH. La inhibición del producto NAD^+ es no competitiva y permite deducir que sólo

se puede captar 1/2 molécula de producto por cada molécula de enzima ; esto es, una molécula de producto por cada centro activo.

De lo anteriormente expuesto, se deduce que el mecanismo de la reacción diaforásica, es fundamentalmente un mecanismo ping-pong, en el cual la secuencia de reacción desde la forma oxidada del enzima a la forma reducida es reversible, y en la reoxidación del enzima se introduce un paso irreversible al producirse la liberación del peróxido de hidrógeno. Las inhibiciones por exceso de sustrato NADH y de producto NAD⁺, se explican por la formación de complejos abortivos de estos reactivos, con las formas oxidada y reducida del enzima.

La actividad oxidásica de la XDH, se ha estudiado frente a la xantina y al oxígeno.;

La representación de Lineweaver-Burck, al igual que en la reacción anterior, no es lineal (recuérdese que ocurría igual en la reacción oxidásica para la XO), aparece una hipérbola o una parábola convexa. En la representación de Hill, el valor de la pendiente es también de 1/2.

Puesto que en el estudio de la reacción oxidásica se obtienen unos valores analíticos más precisos y es más específica del enzima, que la reacción diaforásica, se intentó ajustar por el método de los mínimos cuadrados la curva obtenida por la representación de Lineweaver-Burck a una ecuación teórica, previamente seleccionada. Como la molécula de XDH posee dos centros activos, de igual o distinta afinidad, se intentó ajustar los valores experimentales a una ecuación del tipo:

$$y = \frac{ax^2 + bx + 1}{cx + d}$$

en la que $y = 1/v$ y $x = 1/S$. Según esta ecuación al representar

$1/v$ frente a $1/(\text{xantina})$ se obtiene una hipérbola. Al efectuar la comparación de los valores obtenidos teóricamente y de los valores de $1/v$ experimentales, se observa una mayor discrepancia en los puntos correspondientes a las concentraciones de xantina elevadas.

Las discrepancias observadas indujeron a ajustar los resultados a una ecuación del tipo:

$$ay^2 + by + c = x$$

que corresponde a una parábola convexa y en la cual $y = 1/v$ y $x = 1/S$. La discrepancia entre los valores calculados teóricamente y los experimentales se revela como mínima.

El hecho de que los resultados se adapten a la ecuación anterior y que el coeficiente de Hill sea $1/2$, indican que, con toda probabilidad, el coeficiente que afecta a la concentración de la xantina en la ecuación de velocidad es $1/2$, tal como se había aproximado para los resultados obtenidos en la reacción oxidásica que cataliza la XO. En efecto, la representación de los valores experimentales de $1/v$ frente a $1/(\text{xantina})^{1/2}$ es lineal, lo que confirma que la estequiometría de la reacción es de media molécula de xantina por cada molécula de XDH, igual que en los casos estudiados anteriormente.

También en este caso se propone un mecanismo ping-pong, aunque no se han efectuado los correspondientes estudios de inhibición por sustrato (oxígeno) y por producto (H_2O_2), los efectuados con xantina y ácido úrico permiten formular tal proposición.

El estudio de la reacción oxidásica de la XDH con concentraciones crecientes de xantina no ha permitido obtener la concentración saturante, tal como ocurría con el enzima de procedencia bovina. El ácido úrico, producto de la reacción, es inhibidor no competitivo de la actividad oxidásica de la XDH. De los resultados obtenidos se deduce que el producto puede unirse a va

rias formas del enzima ; si el ácido úrico se adiciona a una forma enzimática que tiene libres los dos centros a los que se puede unir, podrá unirse a ambos, pero también podrá unirse a las distintas formas que tengan únicamente libre uno de ellos. En ambos casos se forman complejos abortivos.

Puede afirmarse que el mecanismo de la reacción oxidásica de la XDH, es fundamentalmente ping-pong. La secuencia de la reacción desde que se une el primer sustrato, la xantina, hasta que se libera el correspondiente producto, el ácido úrico, es reversible y en la reoxidación del enzima por el segundo sustrato, el oxígeno hay un paso, probablemente irreversible, que es la liberación del peróxido de hidrógeno.

También ha sido objeto de estudio la reacción deshidrogenásica que cataliza la XDH, en ella la xantina es oxidada a ácido úrico y el aceptor electrónico es el NAD^+ que se reduce a NADH. En este caso, el mecanismo ha podido establecerse de un modo más completo, puesto que se ha estudiado la reacción con respecto a ambos sustratos y también la inhibición que sobre la actividad enzimática ejercen los dos productos de la reacción.

En el estudio del sistema se puede observar que la representación de Lineweaver-Bruck, cuando la xantina es el sustrato variable es lineal. Cuando el sustrato variable es el NAD^+ , la representación de $1/v$ frente a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$ es lineal. Que las inversas de velocidad se alinean frente a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$ es un hecho que se repite en general a lo largo de las experiencias efectuadas con ambos enzimas en los distintos sistemas, sin embargo es ésta la única ocasión en que la representación de Lineweaver-Burck es lineal cuando el sustrato variable es la xantina. Como la diferencia fundamental de este sistema con las reacciones estudiadas a lo largo del presente trabajo, consiste en el hecho de que el aceptor electrónico es el NAD^+ , la explicación de por qué difiere esta reacción de las otras hay que basarla, precisamente, en este hecho distintivo. Es posible que una molécula del enzima capte una molécula de NAD^+ y ésta modi-

fique de tal forma la conformación de la molécula enzimática que permita la captación de una molécula de xantina por cada hemimolécula de XDH y que el complejo así formado no resulte abortivo, sino que ambos centros resulten capaces de catalizar la transformación de xantina en ácido úrico. Esta molécula de NAD^+ debe actuar únicamente como modificador de la estructura de la molécula enzimática.

El mecanismo de esta reacción no será estrictamente un mecanismo ping-pong, ya que aunque el enzima pase por una forma reducida, después de haber transformado a la xantina en ácido úrico, con anterioridad ha experimentado la influencia de la molécula de NAD^+ modificadora.

La secuencia de reacción que transcurre desde la forma oxidada a la forma reducida es irreversible en el paso de la liberación de la molécula que actúa de modificador. Por el contrario, la secuencia de reacción que reoxida al enzima se ha supuesto reversible ya que si por una parte el NAD^+ es capaz de reoxidar al enzima hasta la forma oxidada, reduciéndose a NADH, también el enzima en forma oxidada al reducirse es capaz de catalizar la oxidación de NADH a NAD^+ (actividad diaforásica).

Se ha efectuado el estudio de la inhibición de la actividad deshidrogenásica por los dos productos de la reacción, el ácido úrico y el NADH. Las inhibiciones por ambos, pueden explicarse por las formas normales de fijación a la secuencia de reacción y por la existencia de formas adicionales que dan lugar a la formación de complejos abortivos.

Cuando se estudia la inhibición que ejercen los productos de la reacción con respecto a la xantina como sustrato variable, la representación de Lineweaver-Bruck continúa siendo lineal, al igual que en ausencia de los productos.

Si la inhibición es producida por el ácido úrico, y el NAD^+ actúa como sustrato variable, los valores de $1/v$ se alinean fren

te a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$. Cuando el que ejerce la inhibición sobre el enzima con respecto al NAD^+ es el NADH , los valores de $1/v$ obtenidos no se alinean en ningún caso frente a las potencias inversas del sustrato consideradas. Este hecho puede ser explicado debido a que si bien la reacción diaforásica a pH 8.0, al que se estudia la presente reacción, es desfavorable, su velocidad de reacción es suficiente para que en presencia de NADH en el medio de reacción pueda éste oxidarse a NAD^+ con la consiguiente interferencia en la determinación correcta de las velocidades iniciales de reacción.

En la inhibición por exceso de xantina, en presencia de NAD^+ como sustrato variable, la representación de los valores de $1/v$ frente a $1/[\text{NAD}^+]^{1/2}$ es lineal, la inhibición es provocada por la formación de complejos abortivos.

Análogamente la inhibición por exceso de NAD^+ con xantina como sustrato variable, la representación de Lineweaver-Burck es lineal.

Los distintos resultados de las inhibiciones se resumen en la tabla XXV.

La ecuación de velocidad que se deduce a partir del mecanismo de reacción propuesto (fig. 36) permite explicar las inhibiciones observadas. Las inhibiciones que ejerce el ácido úrico son debidas a los complejos $\text{E-NAD}^+_{1/2}$ -ác.úrico $_{1/2}$; $\text{F-NAD}^+_{1/2}$ -ac.úrico y $\text{E-NADH}_{1/2}$ -ác.úrico. Las producidas por el NAD^+ son debidas a los complejos $\text{E-NAD}^+_{1/2}$ - $\text{NADH}_{1/2}$ y $\text{E-xantina-NADH}_{1/2}$. Por otra parte, la inhibición por exceso de xantina como sustrato es debida a los complejos $\text{E-NAD}^+_{1/2}$ -xantina y F-xantina . La inhibición por exceso de NAD^+ se debe a los complejos E-NAD^+ y F-NAD^+ .

Así pues el mecanismo de la reacción deshidrogenásica no es un mecanismo ping-pong puro, ya que aunque exista una forma reducida del enzima hay interacción con los dos sustratos, anterior a la liberación de un producto, aunque uno de los dos sustratos

INHIBIDOR	SUSTRATO VARIABLE			NAD ⁺
	XANTINA	XANTINA	XANTINA	
	NAD ⁺ sat.	NAD ⁺ no sat.	xantina sat.	xantina no sat.
AC. URICO	NC puro pte. lineal 1/2 int. lineal 1	NC puro pte. lineal 1/2 int. lineal 1	NC pte. lineal 1 int. lineal 1	NC pte. lineal 1 int. lineal 1
NADH	NC puro pte. lineal 1/2 int. lineal 1/2	NC puro pte. lineal 1/2 int. lineal 1/2	NC no lineal	NC no lineal
XANTINA			NC pte. lineal 1 int. lineal 1	
NAD ⁺	NC pte. lineal 1/2 int. lineal 1/2			

interaccionar únicamente como modulador de la acción. Fundamentalmente todos los pasos de la secuencia reaccional pueden ser considerados reversibles, excepto aquél que produce la liberación de la molécula de NAD^+ , que actúa como modulador.

El conocimiento del comportamiento cinético de la XDH, se ha completado con el estudio de la reacción de oxidación de la hipoxantina a xantina cuando el enzima utiliza al ácido úrico como aceptor electrónico, el cual a su vez se reduce a xantina.

El pH óptimo del sistema es de alrededor de 6, al cual se efectuaron las determinaciones de actividad. Las representaciones de $1/v$ frente a $1/S$ proporcionan rectas paralelas, lo cual es un indicio de un mecanismo ping-pong y permite el cálculo de los correspondientes parámetros cinéticos. El exceso de los dos sustratos inhibe la actividad enzimática. Cuando el sustrato que se encuentra en exceso es el ácido úrico, la inhibición es acompetitiva con respecto a la hipoxantina, considerada como sustrato variable, y la representación de las intersecciones frente a ácido úrico es una parábola o una hipérbola cóncava. La inhibición que ejerce el exceso de hipoxantina sobre la actividad enzimática con respecto al ácido úrico como sustrato variable, es no competitiva mezclada, y la representación de las intersecciones y de las pendientes frente a la concentración de hipoxantina inhibidora, da lugar a hipérbolas o parábolas convexas.

El producto de la reacción, la xantina, es inhibidor no competitivo mezclado con respecto a los dos sustratos. Las representaciones secundarias de las intersecciones y de las pendientes son lineales, en todos los casos, frente a la concentración de xantina inhibidora.

Los resultados comentado permiten postular un mecanismo tal como se describe en la fig. 86, en la que puede observarse que el carácter hipérbólico de las representaciones secundarias es

atribuible a un circuito de reacción accesorio entre las formas enzimáticas F y F-ác.úrico.

Los complejos normales de reacción y los complejos F-ác.úrico-hipoxantina y F-hipoxantina, son los responsables de las inhibiciones observadas. Por otra parte, debe suponerse que los pasos que unen los complejos E-hipoxantina y F-xantina, y los que unen F-xantina y F son irreversibles, así como en el circuito accesorio, el paso que relaciona F.ác.úrico-hipoxantina y F-ác.úrico. Todos los demás pasos se consideran reversibles.

6

CONCLUSIONES

1º Se propone un método de purificación de la XO que proporciona un preparado 256 veces más activo que el tejido de partida y se halla exento de actividad uricásica. La obtención de inicia a partir de un homogeneizado en sacarosa 0,25 M, separación de la fracción mitocondrial, tratamiento térmico a 56°C, fraccionamiento con sulfato amónico, cromatografía en DEAE-celulosa y cromatografía con la resina de exclusión G₂₀₀.

2º En la molécula de XO y en la de XDH existen dos grupos ionizables comunes, cuyos valores de pK se hallan situados alrededor de 6,2 y 8,5 ; pueden corresponder a un grupo imidazol de la histidina y a un grupo persulfuro, ambos necesarios para la actividad catalítica.

En la XO aparece un grupo de pK 9,2 ; se asigna a un grupo ε-amonio de la lisina, el cual no aparece en la XDH.

La XDH posee un grupo ionizable a pH 7,5 aproximadamente, cuya existencia sólo se pone de manifiesto cuando el NAD⁺ es el aceptor electrónico de la reacción ; se sugiere que sea preciso para la actividad deshidrogenásica.

3º El PCMB inhibe irreversiblemente al enzima de ambas procedencias. El reactivo sólo se une al enzima en presencia del sustrato. La inhibición se anula por diálisis y por acción del 2-ME, y es de tipo no competitivo lineal, característica de las inhibiciones irreversibles.

El DTNB no afecta a las actividades de ninguno de los dos enzimas.

42 La NEM y la IAM son inhibidores reversibles de la actividad oxidásica de la XO y de la XDH, pero no afectan a la actividad deshidrogenásica de la última.

La inhibición producida por la NEM es competitiva e hiperbólica, mientras que la que produce la IAM es acompetitiva e hiperbólica.

Sugieren estos resultados que la presencia de NAD^+ como aceptor electrónico de la XDH, impide la inhibición por la NEM y la IAM.

52 La XO al ser tratada con DTE o DTT, adquiere actividad de deshidrogenasa, que se conserva después de la eliminación de los reactivos inductores por diálisis. Las representaciones de ble recíprocas de la actividad deshidrogenásica inducida, frente al NAD^+ o la xantina, proporcionan rectas paralelas, lo que es indicio de que se ajusta a un mecanismo ping-pong y en ello coincide con la XDH.

El 2-ME y el NaSO_3H no inducen actividad deshidrogenásica y és te último (1×10^{-5} M) inhibe la actividad oxidásica de la XO.

62 Las actividades oxidásica y deshidrogenásica de la XDH, no se alteran al someter al enzima a la acción de la tripsina? ✓-quimotripsina y la subtilisina, en contraposición con el incremento producido en la actividad oxidásica de XDH de hígado de rata por acción de las proteasas tisulares.

72 La XO posee actividad de diaforasa. En la ecuación que expresa la velocidad de reacción, el término que representa la concentración de NADH debe elevarse a 2/2 para que las representaciones de $1/v$ frente a $1/[\text{NADH}]^{1/2}$ sean lineales. La actividad diaforásica no es inhibida por NADH, cuya concentración sa turante no se alcanza, pero si por el NAD^+ , producto de la

reacción, que se comporta como inhibidor competitivo lineal con respecto a $[\text{NAD}^+]^{1/2}$.

El ácido úrico inhibe incompetitivamente la actividad diaforásica y la representación de las intersecciones no es lineal respecto a $[\text{ác.úrico}]^{1/2}$, 1 ó 2.

Los resultados expuestos permiten afirmar que la actividad diaforásica se ajusta a un mecanismo ping-pong, pero el producto de la reacción se une a la forma oxidada del enzima.

89 La XO ~~exhibe~~ actividad oxidásica. Las representaciones de $1/v$ frente a las inversas de las concentraciones de los sustratos, xantina o hipoxantina, son lineales si sus concentraciones se elevan a 0.5 ; por ello en la ecuación de velocidad los términos que afectan a la concentración, se hallan elevados a dicha potencia.

La hipoxantina (superior a 4×10^{-5} M) produce inhibición por sustrato. La representación es lineal cuando se expresa $1/v$ frente a $[\text{hipoxantina}]^{1/2}$, lo que indica que en la ecuación de velocidad el término que afecta a la concentración se halla elevado a la unidad.

El ácido úrico es inhibidor con respecto a ambos sustratos. Cuando el sustrato variable es la xantina, la inhibición es de tipo no competitivo; las representaciones secundarias de las intersecciones y de las pendientes son lineales con respecto a la concentración de inhibidor elevada a $1/2$. Cuando el sustrato variable es la hipoxantina, la inhibición es también no competitiva, pero difiere en que la representación de las intersecciones es lineal con respecto a la concentración del inhibidor.

La actividad oxidásica de la XO es inhibida por NADH y la inhibición es incompetitiva con respecto a la xantina. En este caso,

la representación secundaria de las intersecciones no se adapta a la linealidad al elevar la concentración del inhibidor a potencias sencillas.

92 En la actividad diaforásica de la XDH se obtiene linealidad al representar las inversas de velocidad frente a la concentración de NADH elevada a $1/2$. El NADH (superior a 1×10^{-4} M) inhibe por sustrato, a diferencia de lo observado con la XO ; la inhibición no es lineal respecto a la concentración del sustrato elevada a potencias sencillas.

La inhibición que provoca el NAD^+ es no competitiva ; en la representación de las intersecciones se obtiene linealidad frente a $[\text{NAD}^+]^{1/2}$; mientras que en la de las pendientes aquélla no aparece al elevarla a potencias sencillas.

Por todo ello, el producto de la reacción debe fijarse a la forma enzimática que corresponde en la secuencia de reacción ; así como a otras formas con las que origina complejos aboxtivos, a diferencia de lo que ocurre en la XO.

102 La actividad oxidásica de la XDH frente a xantina se expresa por una ecuación de velocidad en que la concentración del sustrato se halla elevada a $1/2$, al igual que en la XO d

El ácido úrico es inhibidor no competitivo de la reacción oxidásica y la representación secundaria de las intersecciones es lineal frente a la concentración del inhibidor y la de las pendientes, lo es frente a la potencia $3/2$ del citado producto ; en ello se diferencia de lo que ocurre en la reacción oxidási-ca de la XO, en la que ambas representaciones son lineales regpecto a $[\text{ác. úrico}]^{1/2}$. si el sustrato considerado es la xantina.

110 En la reacción deshidrogenásica de la XDH, la concentración del sustrato xantina viene afectada por el exponente unidad en la ecuación de velocidad ; sin embargo, la de NAD^+ está afectada por el exponente $1/2$. La concentración saturante de xantina es 2×10^{-4} M y la de NAD^+ $1,4 \times 10^{-3}$ M ; si las concentraciones son superiores, ambos sustratos inhiben al enzima.

La inhibición producida por exceso de xantina es de tipo no competitivo ; la representación secundaria de las intersecciones y de las pendientes es lineal con respecto a la concentración de dicho sustrato.

La inhibición por exceso de NAD^+ es, asimismo, no competitiva ; las representaciones secundarias son lineales con respecto a la concentración del inhibidor elevada a $1/2$.

El ácido úrico, producto de la reacción, es inhibidor no competitivo con respecto a la xantina, independientemente del NAD^+ ; la representación secundaria de las intersecciones es lineal con respecto al inhibidor y la de las pendientes lineal con respecto al inhibidor elevado a $1/2$.

El ácido úrico produce, también, inhibición no competitiva con respecto al NAD^+ , independientemente de la concentración de xantina ; en este caso la representación secundaria de las intersecciones y de las pendientes es lineal con respecto a la concentración del inhibidor.

El otro producto de la reacción, el NADH, también inhibe al enzima. Cuando el sustrato variables la xantina la inhibición es de tipo no competitivo e independiente de la concentración del NAD^+ ; la representación de las intersecciones y de las pendientes es lineal con respecto a $[\text{NADH}]^{1/2}$.

Sin embargo, la inhibición que ejerce el NADH con respecto al NAD^+ , aunque es aparentemente no competitiva, resulta indeter

minable, ya que al tener lugar simultáneamente la reacción diaforásica las velocidades vienen afectadas por la velocidad de dicha reacción.

12º La oxidación de la hipoxantina a xantina por medio de la XDH con el ácido úrico como aceptor electrónico, da lugar en la representación de Lineweaver-Bunck a la aparición de rectas paralelas.

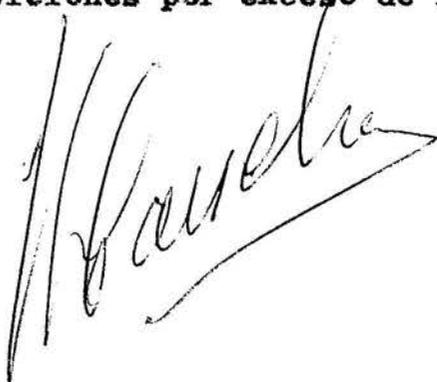
El ácido úrico a concentraciones mayores de la saturante (5×10^{-5} M) produce inhibición por sustrato, que es acompetitiva con respecto a la hipoxantina.

La representación secundaria de las intersecciones da lugar a una hipérbola cóncava.

La hipoxantina a concentración superior a la saturante (5×10^{-4} M) produce también inhibición por exceso de sustrato, la cual es de tipo no competitivo con respecto al ácido úrico. La representación secundaria de las intersecciones y de las pendientes es no lineal ; aparecen hipérbolas convexas con respecto a la concentración del inhibidor.

La xantina, producto de la reacción, es inhibidor de tipo no competitivo lineal con respecto a cada uno de los sustratos independiente~~mente~~ del sustrato que permanece constante.

Los resultados anteriores permiten proponer la existencia de un circuito accesorio de reacción, el cual provoca la aparición de las hipérbolas en las inhibiciones por exceso de los sustratos.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'H. Casado', is written over the bottom right portion of the page. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke at the end.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Enzimes Nomenclature Recomendations 1.972 of the I.U.B. Elsevier 1.973 pg. 46
- (2) HORBACZEWSKI, J., J. Monatsh. Chem. 12, 221-, (1.882).
- (3) SPITZER, W., Arch. Ges. Physiol. 76, 192-, (1.899).
- (4) BURRIAN, R., Z. Physiol. Chem., 43, 497-, (1.905).
- (5) BALL, E.G., J. Biol. Chem. 128, 51-67, (1.939).
- (6) CORRAN, H.S., DEWAN, J.G., GORDON, A.H., GREEN, D.E., Biochem. J., 33, 1.694-1.706, (1.939).
- (7) HERECKER, B.L., HEPPEL, L.A., J. Biol. Chem., 178, 683-690, (1.949).
- (8) AVIS, P.G., BERGEL, F., BRAY, R.C., J. ~~Biochem.~~ **Chem**, 1.100-1.105, (1.955).
- (9) KIELLEY, R.K., J. Biol. Chem., 276, 405-412, (1.955)
- (10) BRUMBY, P.E., Biochem. J., 89, 46-47, (1.963).
- (11) REMY, C.N., RICHERT, D.A., DOISY, R.J., WELLS, I.C., WESTERFELD, W.W., J. Biol. Chem. 217, 293/305, (1.955)
- (12) RAJAGOPALAN, K.V., HANDLER, P., J. Biol. Chem., 242, 4.097-4.107, (1.967).
- (13) GUBERT, S., BOZAL, J., Rev. ~~Esp.~~ **Fisiol.**, 28, 213-224, (1.972).
- (14) DIKSTEIN, S., BERGMANN, F., HENIS, Y., J. Biol. Chem., 224, 67-77, (1.957).
- (15) BRADSHAW, W.H., BARKER, H.A., J. Biol. Chem., 235, 3.620-3628, (1.960).
- (16) IRZYKIEWICZ, H., Aust. J. Biol. Sci., 8, 369-377, (1.955).
- (17) LANDON, E.J., CARTER, C.E., J. Biol. Chem., 235, 819-824, (1.960).
- (18) LOWRY, O.H., BESSEY, O.A., CRAWFORD, E.J., J. Biol. Chem., 180, 399-410, (1.949).

- (19) MORELL, D.B., *Biochem. J.*, 51, 657-666, (1.952).
- (20) MCGARTOLL, M.A., PICK, F.M., SWANN, J.C., BRAY, R.C.,
Biochim. Biophys. Acta., 212, 523-526, (1.970).
- (21) AVIS, P.G., BERGEL, F., BRAY, R.C., *J. Chem. Soc.*
1.219-1.226, (1.956).
- (22) BRAY, R.C., *Biochem. J.*, 81, 189-193, (1.961).
- (23) BRAY, R.C., *Biochem. J.*, 81, 196-199, (1.961).
- (24) BRAY, R.C., MERIWETHER, L.S., *Nature*, 212, 467-469,
(1.966).
- (25) BRAY, R.C., WATTS, D.C., *Biochem. J.*, 98, 142-148,
(1.966).
- (26) MASSEY, V., BRUMBY, P.E., KOMAI, H., *J. Biol. Chem.*,
244, 1.682-1.691, (1.969).
- (27) DIXON, M., KEILIN, D., *Proc. Roy. Soc. B*, 119, 159-190,
(1.936).
- (28) FRIDOVICH, I., HANDLER, P., *J. Biol. Chem.*, 231,
899-911, (1.958).
- (29) RAJAGOPALAN, K.V., HANDLER, P., *J. Biol. Chem.*, 239,
2.027-2.035, (1.964).
- (30) KANDA, M., BRADY, F.U., RAJAGOPALAN, K.V., HANDLER, P.,
J. Biol. Chem., 247, 765-770, (1.972).
- (31) COUGHLAN, M.P., RAJAGOPALAN, K.V., HANDLER, P.,
J. Biol. Chem., 244, 2.658-2.663, (1.969).
- (32) MASSEY, V., EDMONSON, D.E., *J. Biol. Chem.*, 245,
6.595-6.598, (1.970).
- (33) EDMONSON, D.E., MASSEY, V., PALMER, G., ELION, G.B.,
J. Biol. Chem., 247, 1.597-1.604, (1.972).
- (34) KOMAI, H., MASSEY, V., PALMER, G., *J. Biol. Chem.*,
244, 1.692-1.700, (1.969).
- (35) BAKER, B.R., HENDRICKSON, J.L., *J. Pharm. Sci.*, 56,
955-962, (1.967).

- (36) SMITH, S.T., RAJAGOPALAN, K.V., HANDLER, P., J. Biol. Chem., 242, 4.108-4.117, (1.967).
- (37) WATTS, B., Biochem. J., 98, 142-148, (1.966).
- (38) KOMAI, H., MASSEY, V., **Klavins and Flavoproteins.** (H. KAMIN, ed.), pg. 399. Univ. Parck Press, Baltimore, Maryland (1.971).
- (39) HART, L.I., MCGARTOLL, M.A., CHAPMAN, H.R., BRAY, R.C., Biochem. J., 116, 351-364, (1.970).
- (40) MCGARTOLL, M.A., BRAY, R.C., Biochem. J., 114, 443-444, (1.969).
- (41) MASSEY, V., KOMAI, H., PALMER, G., J. Biol. Chem., 245, 2.837-2.844, (1.970).
- (42) ESCARMIS, C., Tesis Doctoral, Dep. Bioquim.; Fac. Quim., Univ. Barcelona, (1.969).
- (43) BRAY, R.C., **The Enzymes, Vol. XII**, pg. 299, 3^a Ed., (Ed. Paul D. Boyer), Acad. Press, NY (1.975).
- (44) BRAY, R.C., PALMER, G., BEINERT, H., J. Biol. Chem., 239, 2.667-2.686, (1.964).
- (45) BRAY, R.C., PETERSSON, R., EHRENBERG, A., Biochem. J., 81, 178-189, (1.961).
- (46) BRAY, R.C., VÅNGÅRD, T., Biochem. J., 114, 725-734, (1.969).
- (47) PALMER, G., MASSEY, V., J. Biol. Chem., 244, 2.614-2.620, (1.969).
- (48) OLSON, J.S., BALLOU, D.P., PALMER, G., MASSEY, V., J. Biol. Chem., 249, 4.350-4.362, (1.974).
- (49) OLSON, J.S., BALLOU, D.P., PALMER, G., MASSEY, V., J. Biol. Chem., 249, 4.363-4.382, (1.974).
- (50) EDMONSON, D., BALLOU, D.P., VAN HEVVELEN, A., PALMER, G., MASSEY, V., J. Biol. Chem., 248, 6.135-6.144, (1.973).
- (51) KRENITSKY, T.A., Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 41 A, 51-64, (Ed. Plenum Press), N.Y. London (1.972).

- (52) DELLACORTE, E., STIRPE, F., *Biochem. J.*, 126, 739-745, (1.972).
- (53) BATTELLI, M.G., DELLA CORTE, E., STIRPE, F., *Biochem. J.*, 126, 747-749, (1.972).
- (54) DELLA CORTE, E., STIRPE, F., *Biochem. J.*, 103, 349-351, (1.968).
- (55) STIRPE, F., DELLA CORTE, E. *J. Biol. Chem.*, 244, 3.855-3.863, (1.969).
- (56) DELLA CORTE, E., *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, 2, 83-84, (1.968).
- (57) DELLA CORTE, E., GOZZETTI, R., NOVELLO, F., STIRPE, F., *Biochim. Biophys. Acta*, 191, 164-166, (1.969).
- (58) GREEN, D.E., *Biochem. J.*, 28, 1.550-1.560, (1.934).
- (59) PRIEST, D.G., FISCHER, J.R., *Eur. J. Biochem.*, 10, 439-444, (1.969).
- (60) PRIEST, D.G., *Arch. Biochim. Biophys.*, 146, 391-399, (1.971).
- (61) LOPEZ-SOLANAS, V., *Tesis Doctoral, Dep. Bioquim., Fac. Quim., Univ. Barcelona, Barcelona*, (1.975).
- (62) MASSEY, V., *Iron Sulfur Proteins, Vol. F*, (Ed. Walter Sovenberg) *Acad. Press, N.Y.* (1.973).
- (63) DIXON, M., THURLOV, S., *Biochem. J.*, 13, 976-988, (1.924).
- (64) HOFSTEE, B.H.J., *J. Biol. Chem.*, 216, 235-244, (1.955).
- (65) ACKERMAN, E., BRILL, A.S., *Biochim. Biophys. Acta*, 56, 397-412, (1.962).
- (66) GREEN, E., O'BRIEN, M., *Biochem. J.*, 105, 585-589, (1.967).
- (67) CLELAND, W.W., *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 173-187, (1.963).
- (68) MURAOKA, S., *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 17-26, (1.963)
- (69) MURAOKA, S., *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 27-38, (1.963)
- (70) FRENDOVICH, I., *J. Biol. Chem.*, 239, 3.519-3.521, (1.964)

- (71) DOMINGO, E., Tesis Doctoral, Dep. Bioquim., Fac. Quim., Univ. Barcelona, Barcelona, (1.969).
- (72) ALBERTY, R.A., Advan. Enzymol., 17, 1-64, (1.956).
- (73) DALZIEL, K., Acta Chem. Scand., 11, 1.706-1.723, (1.957)
- (74) CLEERE, W.F., COUGHLAND, M.P., Comp. Biochem. Physiol., 50 B, 311-322, (1.975).
- (75) FRIDOVICH, I., HANDLER, P., J. Biol. Chem., 233, 1.581-1.585, (1.958).
- (76) KISTIAKOWSKY, G.B., ROSENBERG, A.J., J. Am. Chem. Soc., 74, 5.020-5.025, (1.952).
- (77) ALBERTY, R.A., MASSEY, V., FRIEDEN, C., FUHLBRIGGE, A.R., J. Am. Chem. Soc., 76, 2.485-2.493, (1.954).
- (78) FISCHER, J.R., HONIGLAND, V.D., Adv. Biol. Med. Phys., 12, 163-211, (1.968).
- (79) FISCHER, J.R., PRIEST, D.G., BARTON, J.S., J. Theor. Biol., 37, 335-352, (1.972)
- (80) FISCHER, J.R., Arch. Biochem. Biophys. 152, 638-645, (1.972).
- (81) BARTON, J.S., FISCHER, J.R., Biochemistry 10, 577-584, (1.971).
- (82) GOMORI, G., Methods Enzymol., Vol I, Acad. Press N.Y. pg 143, (1.955).
- (83) WARBURG, O., CHRISTIAN, W., Biochem. Z., 310, 384-421, (1.942).
- (84) WARBURG, O., CHRISTIAN, W., ~~Methods~~ Methods Enzymol., Vol III, Acad. Press, N.Y., (1.963), pag. 451.
- (85) BRUGHERA, P., Tesina, Dep. Bioquim., Fac. Quim., Univ. Barcelona, Barcelona, (1.975).
- (86) LOWRY, O.H., ROSEBROIGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.S., J. Biol. Chem., 193, 265-275, (1.951).
- (87) BOYER, P.D., J. Am. Chem. 76, 4.331-4.337, (1.954).

- (88) MICHAELIS, L., MENTEN, M.L., *Biochem. Z.* 49, 333, (1.913). C.A. 7/2232.
- (89) ALBERTY, R.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 1.928-1.932, (1.953).
- (90) LINEWEAVER, H., BURCK, D., *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658-666, (1.934).
- (91) EADIE, G.S. *J. Biol. Chem.*, 146, 85-93, (1.942).
- (92) HORSTEE, B.H.J., *Science* 116, 329-331, (1.952).
Nature 184, 1.296-1.298, (1.959).
- (93) HANES, C.S., *Biochem. J.*, 26, 1.406-1.421, (1.932).
- (94) HALDANE, J.B.S., *Enzymes*, Longmans, London, (Ed. 1.965), pg. 84-85.
- (95) THEORELL, H., CHANCE, B., *Acta Chem. Scand.*, 5, 1.127-1.144, (1.951).
- (96) FLORINI, J.R., VESTLING, C.S., *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 575-578, (1.957).
- (97) CLELAND, W.W. *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 188-196, (1.963).
- (98) FROM, H.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 221-230, (1.967).
- (99) MURRAY, D.R.P., *Biochem. J.*, 24, 1.890-1.896 (1.930).
- (100) CLELAND, W.W., *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 104-137, (1.963).
- (101) DIXON, M., *Biochem. J.*, 55, 161-171, (1.953).
- (102) DIXON, M., WEBB, C.E., *Enzymes 2^a*, Ed. Longman Green, London, (1.967), pg. 315-359.
- (103) HILL, A.V. *J. Physiol.*, 40, 190-, (1.910). C.A. 5/3694.
- (104) CARRASCO, E., MARTIN-ESTEVE, J., CALVET, F., *Rev. Esp. Fisiol.*, 24, 193-, (1.968).
- (105) CARRASCO, E., *Tesis Doctoral*, Dep. Quím., Fac. Quím., Univ. Barcelona, Barcelona, (1.967).

(106) KING, E.L., ALTMAN, C., J. Physiol. Chem., 60,
1.375-1.378, (1.956).

(107) KING, E.L., J. Physiol. Chem., 60, 1.378-1.381. (1.956).