

INHIBICION DE LA XANTINO - OXIDASA (DESHIDROGENASA XANTICA) DEL HIGADO DE POLLO POR LOS ACIDOS FOLICO Y FOLINICO Y POR EL NITROGENO DE MOSTAZA *

Por ROBERTO LLAMAS,
del Instituto de Biología.

La importancia del ácido pteroil-glutámico, o sea el ácido fólico, en diversos procesos metabólicos, ha sido puesta de manifiesto por varios grupos de investigadores. Es muy factible que esta substancia intervenga, como catalizador, en la síntesis de algunos aminoácidos como la histidina, metionina y serina, y de las bases púricas y pirimídicas integrantes de las nucleoproteínas. En relación con estos aspectos metabólicos se han estudiado, por una parte, substancias de acción y estructura semejantes al ácido fólico, y por la otra, los efectos de éste sobre la actividad de sistemas enzimáticos, particularmente de la xantino-oxidasa.

Además, el descubrimiento de los antifólicos, como la aminopterina, o sea el ácido amino-4-pteroil-glutámico, ha dado mayor importancia a estos estudios.

En 1948 Sauberlich y Baumann describieron la presencia de un factor indispensable para el desarrollo del *Leuconost citrovorum* y que designaron con el nombre de factor citrovorum, existente en extractos de hígado, en peptona y en levaduras; el mismo efecto sobre el desarrollo bacteriano fué logrado, aunque en grado mucho menor, con el ácido fólico.

La inhibición que la aminopterina ejerce sobre el desarrollo del *Leuconost*, desaparece en presencia del factor citrovorum, como ha sido demostrado por Broquist y col.

Shive y Col. y Brockman y Col. han obtenido, por reducción y formulación del ácido fólico, un compuesto de actividad semejante a la del factor citrovorum; este compuesto, designado con los nombres de ácido folínico o de Leucovorin, tiene la misma estructura que el factor citrovorum.

Bond y Col. enumeran algunas características semejantes entre ambos

* En este trabajo colaboró la Srita. María Angélica García A., pasante de Biólogo de la Facultad de Ciencias de la U. N. A. y los datos en él consignados servirán para la elaboración de su tesis profesional.

compuestos, y la experimentación ha demostrado que el ácido fólico se transforma y actúa como folínico (factor citrovorum) en el organismo. El contenido de factor citrovorum del Reticulogen aumenta en un 5% al tratarlo con enzimas de riñón de cerdo; aumenta también cuando el hígado de buey se trata con pancreatina. Se ha señalado que el hígado de pollo tiene una enzima que libera factor citrovorum. Este factor es formado por cortes de hígado a partir del ácido fólico sintético, y es capaz de impedir la inhibición que sobre el crecimiento bacteriano provoca la aminopterina en condiciones en que el ácido fólico es inefectivo.

Nichol y Welch han demostrado que los cortes de hígado de rata efectúan esta transformación a partir del ácido fólico sintético y la conversión es inhibida por la aminopterina.

Kalckar y Klenow han demostrado la acción inhibitoria del ácido fólico sobre la xantino-oxidasa de la leche; la inhibición de 0.06 micromoles de enzima reduce su actividad a menos del 5% mediante la presencia de solamente 0.05 micromoles de ácido fólico; los mismos autores han descrito una enzima que transforma el ácido fólico en otra substancia incapaz de inhibir la xantino-oxidasa.

Estudios posteriores de Kalckar y Col. han demostrado que el efecto inhibitorio del ácido fólico sobre la xantino-oxidasa se debe a la transformación de ésta en aldehído-6-pteridil, substancia que se puede obtener mediante hidrólisis del fólico con ácido sulfúrico. El mismo autor y sus colaboradores señalaron, posteriormente, que la inhibición es debida a la 2-amino-6-formil-4-hidroxipteridina; el inhibidor es destruido por la luz ultravioleta o mediante la 2-4-dinitrofenil-hidrazina, y se encuentra como impureza del ácido fólico. La oxidación enzimática de la xantina es inhibida por otras pteridinas según Hofstee. Dietrich y Col. señalan el hecho interesante de que la 6-formil-pteridina inyectada es capaz de inhibir la actividad xantino-oxidásica del hígado de pollo en animales deficientes o normales en ácido fólico; por lo contrario, la inhibición no se efectúa in vitro, por lo cual los autores deducen que el mecanismo biológico mediante el cual se ejerce la inhibición no es a través de la pteridina.

Shaw y Woolley, al estudiar el efecto de las triazinas sobre la xantino-oxidasa, han demostrado que la azaadenina inhibe la actividad de la xantino-oxidasa sobre la xantina y sobre la hipoxantina. Los flavonoides y substancias parecidas, inhiben a la enzima, según Beiler y Martin, quienes afirman, además, que los compuestos más activos son los que poseen estructura de chalcona. La xantino-oxidasa es inhibida competitivamente por los boratos,

según señalan Roush y Norris, debido a la formación de un complejo entre el radical ribitol de la riboflavina y el borato; la adición de ribosa o de algún otro azúcar puede impedir este efecto.

El hecho de que la xantina oxidasa actúe sobre el aldehído acético y de que esta substancia se produce a partir del etanol en el organismo cuando se administra Antabuse, ha llevado a Richert y Col. a estudiar la influencia de esta substancia sobre la enzima; la xantino-oxidasa de hígado de rata, *in vitro*, es inhibida, mientras que no lo es la de la leche; el azul de metileno impide la inhibición, por lo que concluyen que el Antabuse afecta solamente el fenómeno de auto-oxidación y no inhibe la actividad deshidrogenásica.

La influencia de algunas vitaminas sobre la xantino-oxidasa ha sido estudiada: Feigelson señala que pequeñas cantidades de ácido 1-ascórbico la inhiben *in vitro*. Dinning ha encontrado que los homogenados de hígado de conejo deficientes en vitamina E poseen gran actividad xantino-oxidásica, mientras que en el hígado de conejos normales dicha actividad es prácticamente nula.

La carencia de proteínas de la dieta modifica la actividad de esta enzima; Meikleham y Col. encuentran que sus valores descienden a cero en el hígado de rata, cuando las proteínas de la dieta, particularmente la caseína, disminuyen al 25% de la concentración normal. Resultados semejantes han sido obtenidos por Remy y Westerfeld en la deshidrogenasa xántica de hígado, páncreas e intestino de pollo; la enzima disminuye con dietas pobres en proteína independientemente de la presencia o ausencia de ácido fólico; por lo contrario, la normalidad en las proteínas y la deficiencia de fólico aumentan notablemente la acción enzimática.

La mayor actividad biológica del ácido folínico en relación con la del fólico, que ha sido señalada sobre todo frente a las substancias antifólicas, nos ha llevado a estudiar, comparativamente, la actividad de la xantino-oxidasa del hígado de pollo normal, y sus modificaciones frente a los ácidos fólico y folínico, bien sea solos o en presencia de aminopterina. Dadas algunas características semejantes entre los efectos biológicos de la aminopterina y del nitrógeno de mostaza (Clorhidrato de N-metil-bis (beta cloroetil)-amina), se estudió también la acción de esta substancia sobre la enzima. Burchenal y Col. han señalado, en efecto, que el factor citrovorum (ácido folínico) impide la acción de la aminopterina sobre la leucomia de la rata y es de doce a veinticuatro veces más activo que el ácido fólico.

Material y métodos

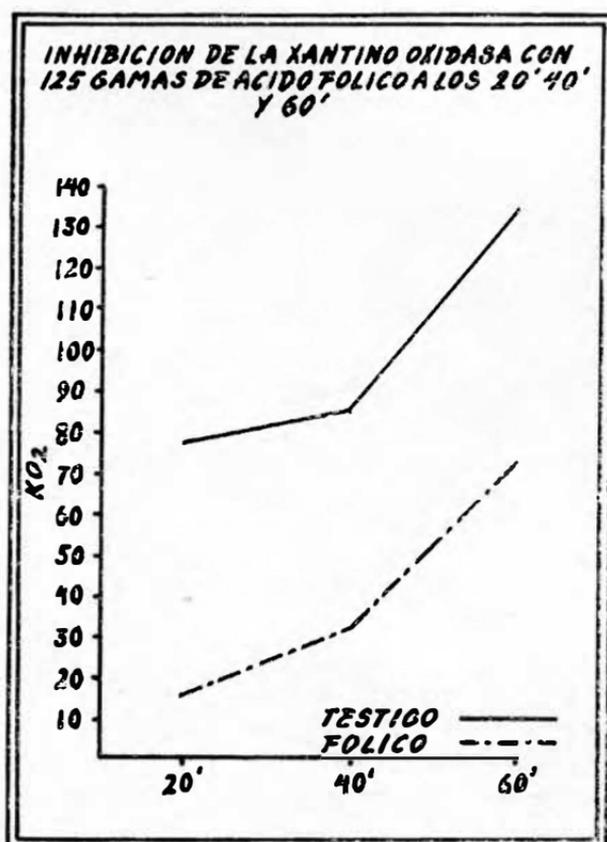
Se utilizó hígado de pollo obtenido inmediatamente después de sacrificado el animal; la preparación del homogenado y del centrifugado, así como la determinación de la actividad xantino-oxidásica, se hicieron de acuerdo con el método de Remy, Richert y Westerfeld, o sea el procedimiento manométrico que utiliza azul de metileno como aceptor de hidrógeno auto-oxidable. Los resultados se expresan en valores KO_2 , obtenidos directamente de los consumos de oxígeno, previas las correcciones necesarias.

Resultados

Inhibición de la xantino-oxidasa por 125 gamas de ácido fólico, a los 20, 40 y 60 minutos:

Como promedio de veinte determinaciones se obtuvieron los resultados que se consignan en la gráfica 1.

GRAFICA 1



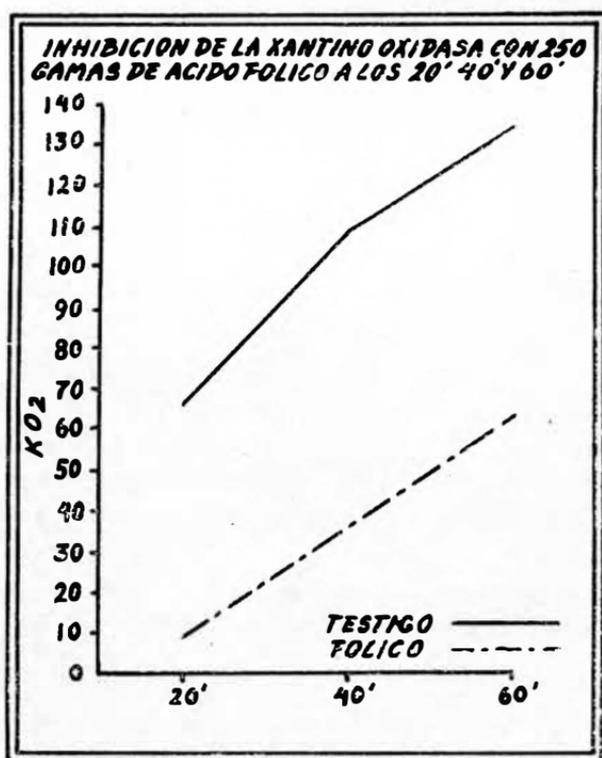
Es decir, la actividad xantino-oxidásica alcanzó valores de 78-84 y 134, a los veinte, cuarenta y sesenta minutos respectivamente, mientras que la adición de ácido fólico los hizo descender a 16-32 y 73.

En las mismas condiciones 250 gamas de ácido fólico produjeron las modificaciones siguientes:

Testigos: 66 - 108 - 134.

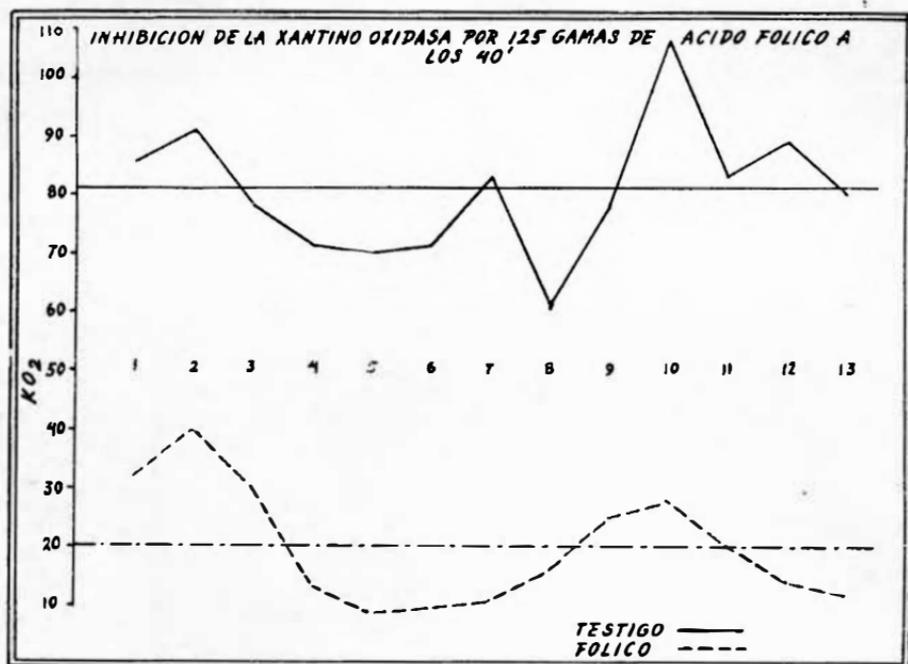
Fólico: 7 - 34 - 63.

GRAFICA 2



En otro experimento se estudió la acción de 125 gamas de ácido fólico sobre la xantino-oxidasa, a los cuarenta minutos exclusivamente:

GRAFICA 3



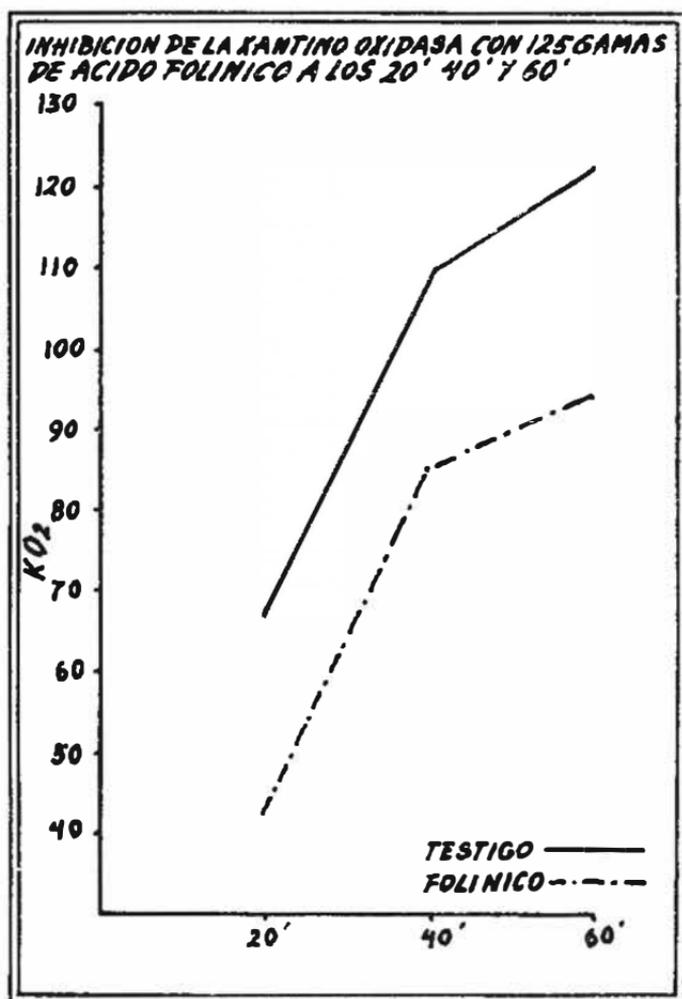
Puede apreciarse en la gráfica 3, integrada por los resultados de trece determinaciones, que el valor máximo de KO₂ en los testigos fué de 107 y el mínimo de 60; el máximo con ácido fólico fué de 40 y el mínimo de 9. A pesar de estas diferencias, las cifras son utilizables y el promedio está representado por KO₂ 81 para los testigos y 20 para el fólico.

Estos resultados concuerdan con los ya señalados por otros autores en experimentos practicados tanto in vitro como in vivo.

Inhibición de la xantino-oxidasa con 125 gamas de ácido folínico a los 20, 40 y 60 minutos:

Como promedio de diez determinaciones se obtuvo el siguiente resultado:

GRAFICA 4



Se aprecia en la gráfica 4, que los valores son 67-108 a los 20, 40 y 60 minutos respectivamente para los testigos, y 42-85 y 95 para el ácido folínico. La inhibición producida por esta substancia es sensiblemente inferior a la producida por el ácido pteroil-glutámico; el hecho queda evidenciado en otra serie de experimentos en la cual pudo establecerse, a los 40 minutos, que la actividad de los testigos tuvo valor promedio de 88 y de 84 la del ácido folínico.

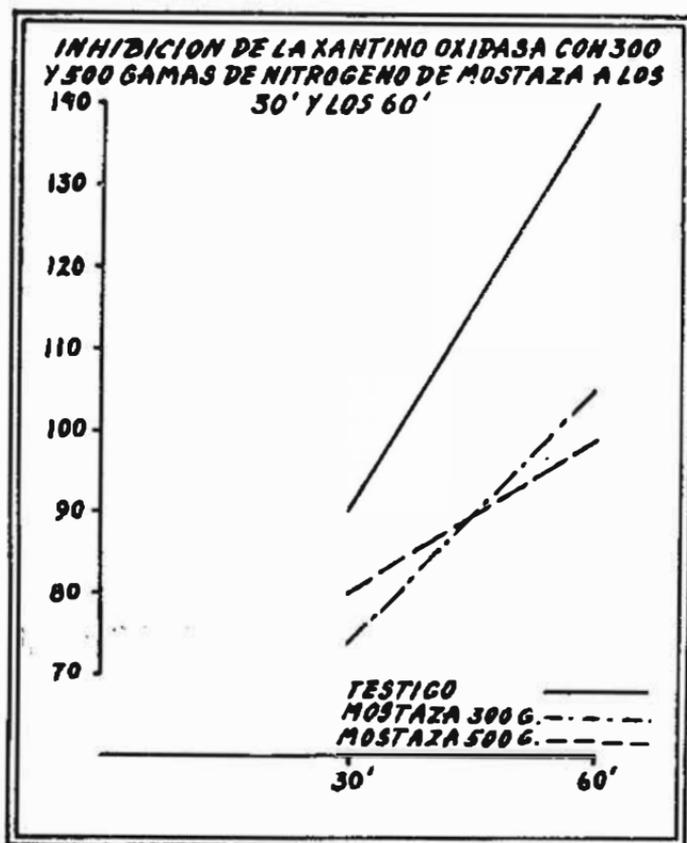
Efecto de la aminopterina sobre la inhibición producida por el ácido fólico:

La aminopterina, a concentraciones equimolares a las de ácido fólico, no impide la inhibición de éste sobre la xantino-oxidasa.

Acción del nitrógeno de mostaza sobre la xantino-oxidasa:

El nitrógeno de mostaza, a concentraciones de 300 y 500 gamas, provocó inhibición de la enzima, como puede apreciarse en la gráfica 5.

GRAFICA 5



Discusión

El ácido fólico experimenta una interesante transformación en el organismo que lo conduce a ácido folínico, identificado, este último, como el

factor citrovorum; el ácido folínico se manifiesta más activo que el fólico y parece demostrado que por diversos mecanismos enzimáticos se logra dicha transformación. En vista de lo anterior, se consideró interesante investigar si el ácido folínico es más activo que el fólico en la inhibición de la xantino-oxidasa; los resultados fueron negativos, por lo que lógicamente se puede pensar que dicha inhibición no se efectúa vía ácido folínico.

La actividad antifólica de la aminopterina no se manifiesta, in vitro, en lo que se refiere a la posible protección sobre la xantino-oxidasa; este hecho tal vez apoye lo señalado por Kalckar y Col. de que la inhibición es producida por sustancias que proceden de la hidrólisis del fólico o que se encuentran como impurezas.

El nitrógeno de mostaza inhibe la actividad xantino-oxidásica.

Resumen y conclusiones

1º La xantino oxidasa del hígado de pollo normal es inhibida, in vitro, por el ácido fólico.

2º El ácido folínico produce, a su vez, inhibición, pero en grado mucho menor que el fólico.

3º La aminopterina no protege a la xantino-oxidasa de la acción inhibitoria del ácido fólico.

4º El nitrógeno de mostaza inhibe, in vitro, la actividad xantino-oxidásica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BEILER, J. M., MARTIN, G. J., 1951.—The Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids and Related Compounds. *J. Biol. Chem.* 192:831.
- BOND, T. J., BARDOS, T. J., SIBLEY, M., SHIVE, W., 1949.—The Folinic Acid Group, a Series of New Vitamins Related to Folic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 71:3852.
- BROCKMAN, J. A., ROTH, B., BROQUIST, H. P., HULTQUIST, M. E., SMITH, J. M., FAHRENBACH, M. S., COSULICH, D. B., PARKER, R. P., STOKSTAD, E. L. R., JUKES, T. H., 1950.—Synthesis and Isolation of a Crystalline Substance with the Properties of a New B Vitamin. *J. Am. Chem. Soc.* 72:4325.
- BROQUIST, H. P., STOKSTADT, E. L. R., JUKES, Th. H., 1950.—Some Biological and Chemical Properties of the Citrovorum Factor. *J. Biol. Chem.* 185:399.

- BURCHENAL, J. H., BABCOCK, G. M., BROQUIST, H. P., JUKES, T. H. 1950.—Prevention of Chemotherapeutic Effects of 4-Amino-N 10-Methyl Pteroylglutamic Acid on Mouse Leukemia by Citrovorum Factor. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 74:735.
- DIETRICH, L. S., MONSON, W. J., WILLIAMS, J. N., ELVEHJEM, C. A., 1952.—A Comparison of the Effects of 6-Formyl Pteridine on Chick Liver Xanthine Oxidase Activity in Vivo and in Vitro. *J. Biol. Chem.* 197:37.
- DINNING, J. S., 1953.—An Elevated Xanthine Oxidase in Livers of Vitamine Deficient Rabbits. *J. Biol. Chem.* 202:213.
- FEIGELSON, Ph., 1952.—The Inhibition of Xanthine Oxidase in Vitro by Trace Amounts of 1-Ascorbic Acid. *J. Biol. Chem.* 197:843.
- HOFSTEE, B. J., 1949.—Inhibition of the Enzymic Oxidation of Xanthine and Xanthopterin by Pteridines. *J. Biol. Chem.* 179:633.
- KALCKAR, H. M., KLENOW, H., 1948.—Milk Xanthopterin Oxidase and Pteroylglutamic Acid. *J. Biol. Chem.* 172:349.
- KALCKAR, H. M., KLENOW, H., 1948.—Enzymic Transformation of Pteroylglutamic Acid. *J. Biol. Chem.* 172:357.
- KALCKAR, H. M., KJELDGAARD, N. O., KLENOW, H., 1948.—Inhibition of Xanthine Oxidase and Related Enzymes by 6-Pteridyl Aldehyde. *J. Biol. Chem.* 174:771.
- KEITH, C. K., BROACH, W. V., WARREN, D., DAY, P. L., TOTTER, J. A., 1948.—Xanthine Oxidase and Tyrosinase in the Livers of Chicks Receiving Graded Levels of Dietary Pteroylglutamic Acid. *J. Biol. Chem.* 176:1095.
- MEIKLEHAM, V., WELLS, I. C., RICHERT, D. A., WESTERFELD, W. W., 1950.—Liver Esterase and Xanthine Oxidase During Protein Depletion. *J. Biol. Chem.* 192: 657.
- NICHOL, C. A., WELCH, A. D., 1950.—On The Mechanism of Action of Aminopterin. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 74:403.
- REMY, CH., WESTERFELD, W. W., 1951.—The Effect of Diet on Xanthine Dehydrogenase in Chicken Tissues. *J. Biol. Chem.* 193:659.
- REMY, CH., RICHERT, D. A., WESTERFELD, W. W., 1951.—The Determination of Xanthine Dehydrogenase in Chicken Tissues. *J. Biol. Chem.* 193:649.
- RICHERT, D. A., VANDERLINDE, R., WESTERFELD, W. W., 1950.—The Composition of Rat Liver Xanthine Oxidase and its Inhibition by Antabuse. *J. Biol. Chem.* 186:201.
- ROUSH, A., NORRIS, E. R., 1950.—The Inhibition of Xanthine Oxidase by Borates. *Arch. of Bioch.* 29:344.
- SAUBERLICH, H. E., BAUMANN, C. A., 1948.—A Factor Required for the Growth of *Leuconost citrovorum*. *J. Biol. Chem.* 176:165.

- SHAW, E., WOOLLEY, D. W., 1952.—Imidazol-1, 2, 3 Triazines as Substrates and Inhibitors for Xanthine Oxidase. *J. Biol. Chem.* 194:641.
- SHIVE, W., BARDOS, T. J., BOND, T. J., ROGERS, L. L., 1950.—Synthetic Members of the Folinic Acid Group. *J. Am. Chem. Soc.* 72:2817.
- WESTERFELD, W. W., RICHERT, D. A., 1952.—The Determination of Xanthine Oxidase in Rat Liver and Intestine. *J. Biol. Chem.* 199:393.

NOTA SOBRE LA DESHIDROGENASA XÁNTICA EN EL TEJIDO TIROIDEO DE CONEJO

Se ha investigado la presencia de deshidrogenasa xántica (xantino-oxidasa) en el tejido tiroideo mediante el procedimiento manométrico de Remy, Richert y Westerfeld.

De acuerdo con estos autores, la mencionada enzima debe considerarse como deshidrogenasa en vista de su comportamiento en presencia o en ausencia de azul de metileno.

Se utilizó tiroides de conejo sacrificado inmediatamente antes de practicar las determinaciones, e hígado de pollo, obtenido en condiciones semejantes, como testigo.

Los resultados, expresados en KO_2 , fueron los siguientes:

Hígado	KO_2
1.	27.71
2.	28.00
3.	27.52
4.	27.58
5.	27.32
 Tiroides	
1.	00.00
2.	00.00
3.	00.00
4.	00.00
5.	00.00