

CONSIDERACIONS SOBRE LA URICOGÈNESI

Comunicació presentada el dia 18 de gener de 1968 pels doctors

J. BOZAL i FES

Professor adjunt del Departament de Bioquímica de la Facultat de Ciències
de Barcelona

J. MARTÍN-ESTEVE

Professor adjunt del Departament de Bioquímica de la Facultat de Ciències
de Barcelona

i

F. CALVET i PRATS

Cap del Departament de Bioquímica de la Facultat de Ciències
de Barcelona

La bioformació d'àcid úric, que en els animals superiors té lloc principalment en el fetge per l'acció enzimàtica de la xantindeshidrogenasa hepàtica, constitueix un capítol del metabolisme nitrogenat la importància intrínseca del qual ha centrat l'atenció de molts investigadors. Sembla fora de dubte l'existència d'una correlació entre la hiperuricèmia i el síndrome gotós, la qual cosa concedeix un interès clínic addicional al coneixement dels detalls de la síntesi biològica de l'esmentada hidroxipurina.

Hom es pregunta si la hiperuricèmia i l'acumulació localitzada de dipòsits d'urats a les articulacions —gairebé sempre observats en la gota crònica— són la conseqüència d'una anormal sobreproducció hepàtica d'àcid úric, o han d'atribuir-se fonamentalment a un funcionament defectuós dels mecanismes renals d'eliminació del metabolit. L'opinió més generalitzada atribueix la hiperuricèmia principalment a la primera possibilitat, i, per tant, el mecanisme d'actuació d'alguns agents terapèutics antigota, amb molta probabilitat s'exerceix sobre la dita biosíntesi. Així, l'hepatocatalasa utilitzada com a agent terapèutic, segons Barceló i Puig Muset², podria interferir la fixació del «formil» necessari per a la formació del nucli purínic. Altrament, nosaltres creiem haver pogut demostrar que la colquicina, la qual des de fa tant de temps ha estat administrada amb positius resultats clínics, a més d'altres possibles vies d'actuació, pot interferir la uricogènesi precisament en els últims estadis de la síntesi de l'àcid úric.

Fa ja alguns anys que aquests problemes han atret l'atenció del nostre Departament de Bioquímica. Per això hem tractat d'aprofundir en el coneixement dels mecanismes enzimàtics de l'esmentada biosíntesi úrica investigant alguns aspectes de la seva normal autoregulació hepàtica, així com les influències induïdes per la concurrència d'alguns productes emprats amb èxit en el tractament de les malalties gotoses.

Ens proposem de descriure aquí, de forma resumida, els principals resultats experimentals aconseguits pel nostre grup, així com les nostres interpretacions dels fets que hem pogut observar.

* * *

És ben sabut que en els animals de catabolisme nitrogenat ureotèlic, els precursors immediats de la bioproducció d'àcid úric són la hipoxantina i la xantina, purines que per l'acció catalítica de la xantindeshidrogenasa del fetge experimenten la corresponent deshidrogenació:

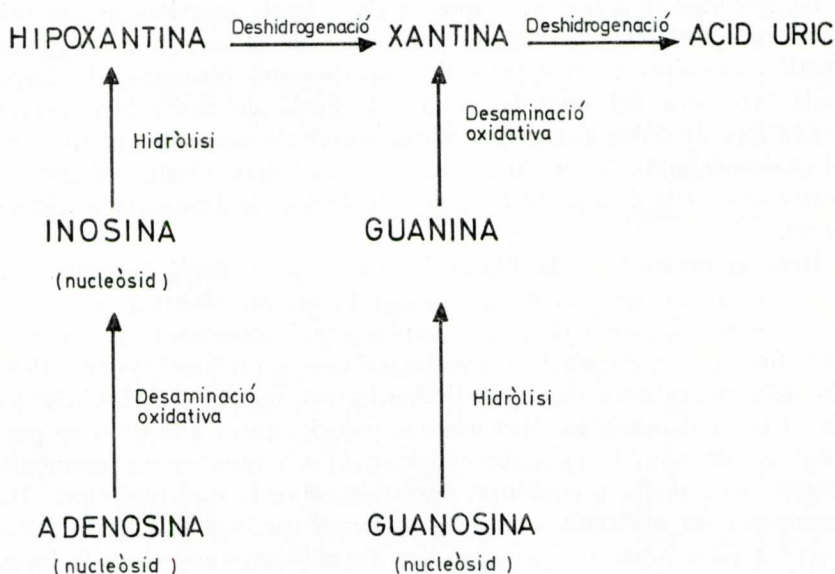


FIG. 1. — La hipoxantina i la xantina es formen per desaminacions oxidatives, més hidròlisi de l'adenosina i la guanosina, respectivament. Aquests nucleòsids, a llur torn, resulten de la degradació dels àcids nucleics propis de les cèl·lules, així com dels ingerits amb els aliments nucleoproteics dels animals.

La xantindeshidrogenasa hepàtica —catalitzador de la deshidrogenació d'ambdues bases púriques que mena a l'àcid úric— és un enzim que existeix en el fetge animal en quantitats substancials, bé que no actua en forma quantitativament indiscriminada: nosaltres hem pogut comprovar «in vitro» que experimenta una ben acusada inhibició de la seva activitat quan la concentració de substrat present —xantina o hipoxantina— sobrepassa un cert límit. Treballant amb homogenats hepàtics de pollastres i de porc, o bé amb preparats de l'enzim parcialment purificats per precipitació fraccionada amb sulfat amònic —i també amb leucòcits de cavall—, i emprant xantina com a substrat, hom comprova que l'activitat de la deshidrogenasa present —mesurada establint els μ M d'úric produïts per minut i per mil·lilitre de preparat enzimàtic o d'homogenat— minva osten-

siblement sempre que la quantitat de substrat present sobrepassa la concentració d' 1×10^{-4} M.^{14, 3}. Una observació semblant d'inhibició pel mateix substrat, havia estat feta prèviament amb la xantinaoxidasa de la llet⁹.

La majoria de les nostres experiències han estat realitzades incubant durant temps creixents barreges d'homogenat hepàtic o de preparat enzimàtic purificat amb xantina addicionada, i en presència de blau de metilè —acció deshidrogenàsica— com a transportador electrònic. Hem determinat colorimètricament les quantitats d'àcid úric formades mitjançant el reactiu de Brown¹.

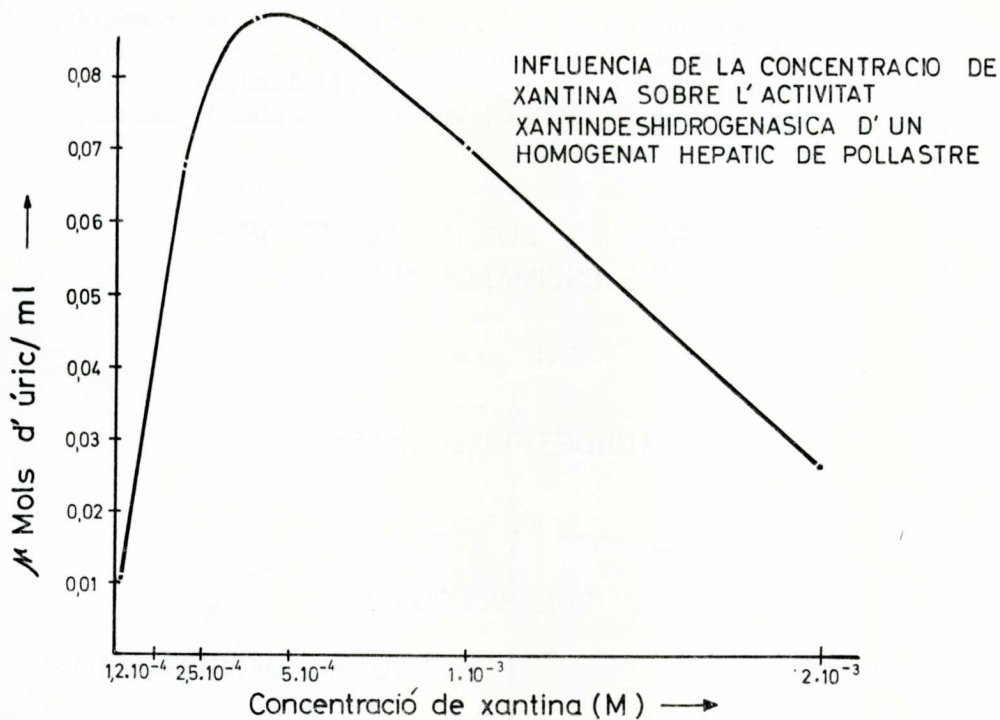


FIG. 2

Si aquest fenomen d'inhibició per excés de substrat permet de fer una extrapolació per a tractar d'interpretar allò que deu succeir en el fetge d'un animal enter, el nivell hepàtic de xantina del qual és normalment superior a 1×10^{-4} M. (segons determinacions pròpies, el contingut mitjà de xantina en el fetge de pollastre és de 3×10^{-4} M.; en el de porc és d' $1,5 \times 10^{-3}$ M.; en el de rata és de 2×10^{-3} M.; en el de conill d'índies, de $3,3 \times 10^{-3}$ M.; i en l'humà, de 2×10^{-3} M.), la producció d'àcid úric seria

regulada —limitada— per la mateixa concentració de substrat que actuaria autoinhibint parcialment l'activitat enzimàtica de la xantindeshidrogenasa. El sentit fisiològic d'aquesta hipòtesi consistiria en el fet que una acumulació accidental de quantitats anormals de la base púrica en el fetge, lluny de convertir-se ràpidament en úric —amb tots els perills implícits en la minúscula solubilitat de l'àcid i en la tendència dels urats a cristallitzar (gota)—, exerciria una limitació automàtica de la bioproducció del metabolit.

Els fets observats, emperò, no permeten sempre una interpretació tan senzilla. Malgrat que han estat publicats experiments d'injecció repetida de xantina intraperitoneal a rates, i que hom afirma haver aconseguit d'augmentar el nivell de xantindeshidrogenasa del fetge^{5, 7} —inducció enzimàtica?—, no ha estat comprovada cap variació d'activitat deshidrogenàsica en experimentar amb pollets injectats amb xantina, hipoxantina, guanina, adenosina o guanosina¹⁵.

TRANSFERENCIES ELECTRONIQUES DELS SISTEMES ENZIMATICS ACOBLATS

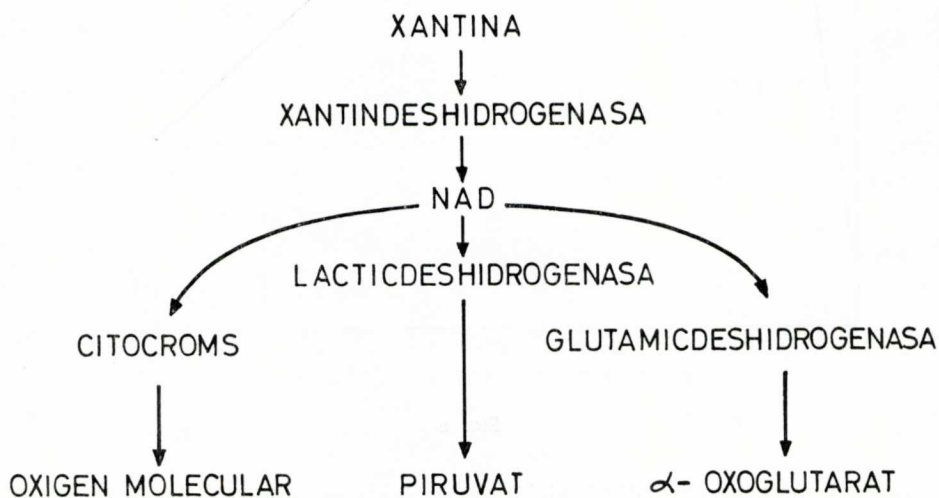


FIG. 3

El fenomen d'inhibició, per efecte del substrat, de la uricogènesi catalitzada per la xantindeshidrogenasa, ha estat comprovat que també té lloc per l'acció d'un excés d'hipoxantina. La copresència d'ambdues purines —hipoxantina i xantina— en una incubació d'homogenat hepàtic provoca

mútues influències inhibidores de la uricogènesi. També inhibeix la transformació de la xantina la presència d'adenina.

Aquestes interaccions seran descrites amb tot detall en un treball d'investigació que actualment tenim en vies de publicació ⁶.

D'altra banda, hom ha pogut comprovar que l'eficàcia uricogènica del sistema xantindeshidrogenàsic del fetge resulta notablement exaltada en acoblar-se amb el sistema de la làcticdeshidrogenasa o de la glutàmicdeshidrogenasa. Treballant en ambient anaerobi amb homogenats hepàtics de pollastre, hem observat que la producció d'àcid úric augmenta quan és afegida a la incubació làcticdeshidrogenasa i piruvat, o bé glutàmicdeshidrogenasa i α -oxoglutarat. La transferència electrònica des de la xantina-xantindeshidrogenasa a l'oxigen molecular —que en el teixit hepàtic normalment té lloc mitjançant els citocroms, i que «in vitro» s'esdevé eficaçment a través del blau de metilè— es realitza amb superior rendiment vers l'àcid pirúvic per mitjà del NAD i de la làcticdeshidrogenasa ^{6, 4}, i en la formació d'úric resulta incrementada.

Aquests resultats —els experiments fets han estat descrits detalladament en els treballs suara esmentats— posen en relleu la importància i el paper fonamental que poden complir els sistemes enzimàtics òxidoreductors de la cadena respiratòria, tals com la làcticdeshidrogenasa i la glutàmicdeshidrogenasa, els quals, en acoblar-se amb la xantindeshidrogenasa, provoquen una uricogènesi exacerbada. Una tal producció incrementada d'àcid úric podria desenvolupar l'estat morbós de la gota, i si això fos cert, ¿podríem pensar, potser, que hauríem de cercar l'origen de la malaltia en un catabolisme anormalment elevat dels hidrats de carboni? Aquest possible lligam entre el metabolisme degradant dels sucres i la uricogènesi no ha estat mai clarament suggerit, i creiem que valdria la pena de plantejar assaigs experimentals i clínics que contribuïssin a il·luminar la hipòtesi.

En tercer lloc, recordem que des de fa més de cent anys és sabut que els extractes de *Colchicum autumnale* —a causa de l'alcaloide aïllat de la planta, la colquicina—, són remeis excel·lents per a combatre la gota i els estats morbosos similarment atribuïbles a un elevat nivell uricèmic i a un excés d'àcid úric en els líquids intersticials. Aquests estats morbosos provoquen la cristallització d'urats en les articulacions i en altres llocs de circulació poc activa. És coneguda l'acció antimitòtica de la colquicina, i la seva influència retardadora sobre alguns enzims. Nosaltres observàrem la potent acció inhibidora que la seva presència exerceix «in vitro» sobre la xantindeshidrogenasa hepàtica —homogenats i preparats enzimàtics purificats—, responsable de la producció d'àcid úric.

Es tracta d'una inhibició competitiva, la constant K_i de la qual ha estat establerta per nosaltres —així com la K_m de l'enzim— amb homoge-

ACOBLEMENT DE LA XANTINDESHIDROGENASA AMB LA LACTICDESHIDROGENASA I LA GLUTAMICDESHIDROGENASA

Composició dels incubats	Activitat xantin — deshidrogenasica μ mols úric/ml/min
X DH, Xantina, Piruvat, NADH	$5,4 \cdot 10^{-3}$
" " " " +LDH	$14,4 \cdot 10^{-3}$
XDH, Xantina, Piruvat, NADH, NH_4^+	$4,8 \cdot 10^{-3}$
" " " " " +GDH	$16,2 \cdot 10^{-3}$

FIG. 4

XDH (Xantindeshidrogenasa) purificada, de fetge de porc: $3,2 \times 10^{-2}$ U.

LDH (Làcticdeshidrogenasa) cristallitzada, de cor de porc: 4,5 U.

GDH (Glutàmicdeshidrogenasa) cristallitzada, de fetge de bou: 0,8 U.

Xantina: $7,5 \times 10^{-5}$ M.

Piruvat sòdic: $1,9 \times 10^{-2}$ M.

α-Oxoglutarat sòdic: 3×10^{-3} M.

NADH: $4,5 \times 10^{-5}$ M.

CLNH_4 : 0,15 M.

Tampó fosfat 0,05 M, de pH 7,4.

Volum total dels incubats: 5,3 ml.

nats de fetge de pollastre: K_i (colquicina) = $2,85 \times 10^{-3}$ M. ($K_m = 3,5 \times 10^{-5}$ M.)^{10, 11}.

Hem comprovat que la forta acció inhibidora de la colquicina —i de la fenilbutazona— sobre la xantindeshidrogenasa de pollastre, també s'efectua sobre les deshidrogenases hepàtiques de mamífers: rata, conill d'Indies i porc. Establertes les corresponents constants amb un preparat enzimàtic purificat de fetge de porc, hem obtingut: $K_m = 2,7 \times 10^{-5}$ M. i K_i (colquicina) = $1,14 \times 10^{-3}$ M.

Treballant amb dos fetges humans —procedents de víctimes d'accidents de tràfic—, hom ha pogut establir les influències inhibidores de la colquicina i de la fenilbutazona sobre la xantindeshidrogenasa hepàtica humana.

EFFECTES INHIBIDORS DE LA COLQUICINA I LA FENILBUTAZONA SOBRE LA XANTINDESHIDROGENASA HUMANA

Inhibidor	Concentració M. 10^{-3}	Inhibició %
Colquicina	6,25	55
"	3,12	45
"	1,25	36
"	0,62	28
Fenilbutazona	15,6	62
"	7,8	45
"	3,1	15
"	1,5	0

FIG. 5

Homogenat hepàtic emprat: 1/5 en tampó fosfat 0,05 M, de pH 7,4.
 Activitat xantindeshidrogenàsica: $6,6 \times 10^{-3}$ U./ml.

Els corresponents valors de les constants de Michaelis-Menten i d'inhibició per colquicina, de la xantindeshidrogenasa humana són: $K_m = 3,1 \times 10^{-5}$ M., i K_i (colquicina) = $2,5 \times 10^{-3}$ M.^{12, 13}.

La inhibició colquicínica de la xantindeshidrogenasa, hem comprovat que s'acusa extraordinàriament «in vitro» quan l'enzim treballa acoblat amb els sistemes de la làcticdeshidrogenasa. Amb aquest fet a la vista, hom pot pensar que l'alcaloide també exhibeix algun poder inhibidor específic sobre l'esmentat sistema enzimàtic aïllat. I hom ha pogut demostrar que, en efecte, la colquicina és fortament inhibidora de la làcticdeshidrogenasa; en canvi, no exerceix cap influència sobre el funcionament normal de la glutàmicdeshidrogenasa.

Per tant, l'extraordinària inhibició induïda per la colquicina sobre la uricogènesi quan s'experimenta «in vitro» amb els sistemes xantindeshidrogenàsics acoblats, podria ésser adequadament explicada, considerant que l'efecte produït és la suma de les accions exercides, simultàniament, sobre cadascun dels dos enzims presents.

Tenint en compte els resultats experimentals conjunts que acabem de resumir, i confiant en la confirmació d'algunes experiències que tenim

INHIBICIO DE LA LACTICDESHIDROGENASA PER LA COLQUICINA

Incubacions	Activitats $\times 10^{-2}$ U./ml	Inhibicions %
Control (sens colquicina)	1,70	—
+ Colquicina $5,4 \times 10^{-3}$ M	0,61	64
+ Colquicina $8,0 \times 10^{-3}$ M	0,08	96

FIG. 6

Piruvat sòdic $5,7 \times 10^{-4}$ M; LDH $2,6 \times 10^{-2}$ U./ml.; NADH 7×10^{-4} M; colquicina a les concentracions indicades. Totes les solucions foren preparades amb tampó fosfat 0.05 M. de pH 7,4. Les activitats foren obtingudes per determinació del piruvat romanent, mitjançant el mètode colorimètric de Friedeman i Haugen ⁸.

actualment en curs de realització, creiem que podem atrevir-nos a formular les següents consideracions hipotètiques sobre la uricogènesi que té lloc en el fetge d'un animal normal, i sobre la disfunció metabòlica que pot originar una sobreproducció úrica (cas de la probable causa principal de la hiperuricèmia i de la gota):

1. La bioformació d'àcid úric per la xantindeshidrogenasa hepàtica en un animal normal, és regulada —limitada— per la concentració del propi substrat enzimàtic (xantina o hipoxantina). Si aquesta concentració està molt per sobre d' 1×10^{-4} M. —sigui normalment o per una causa exògena (règim alimentari) o endògena (degradació nucleoproteica exacerbada)—, l'enzim experimenta una forta inhibició que evita momentàniament una uricogènesi excessiva.

2. Una acumulació prolongada de xantina o hipoxantina en el fetge pot induir un augment del ritme de biosíntesi de la xantindeshidrogenasa, i la pujada de nivell enzimàtic així experimentada pot ésser la causa d'una

formació anormalment exagerada d'àcid úric (hiperuricèmia i síndrome gotós).

3. El fet que la làctideshidrogenasa i la glutàmicdeshidrogenasa provoquin una exaltació de l'eficàcia de la xantindeshidrogenasa en acoblar-s'hi —la qual exaltació és causa d'un increment de la producció d'úric— podria establir l'existència d'una relació entre un morbós catabolisme exacerbat dels sucres, i l'aparició d'un estat d'hiperuricèmia i de gota.

4. La colquicina, en actuar com a potent inhibidor de la xantindeshidrogenasa, així com de la làctideshidrogenasa, ha de provocar una substancial disminució del ritme de formació hepàtica de l'àcid úric; aquestes inhibicions de la uricogènesi observades «in vitro», podrien explicar, si més no parcialment, els beneficiosos efectes terapèutics de l'alcaloide en les afeccions gotoses.

5. Voldríem sotmetre al millor criteri dels fisiopatòlegs i reumatòlegs les interpretacions hipotètiques que hem gosat proposar per veure si poden contribuir a l'aclariment del fosc procés de la uricogènesi i de l'etiologia de la gota.

BIBLIOGRAFIA

1. BROWN, H.: (*J. Biol. Chem.*), 158, 600 (1945).
2. BARCELÓ, P., PUIG MUSET, P. o SANS-SOLA, L.: «First European Conference of Endocrinology». Platja d'Aro, Barcelona (1961).
3. CALVET, F.: Relatorios das «Oitavas Jornadas Bioquímicas Latinas», Lisboa, p. 183 (1965).
4. CARRASCO, E., MARTÍN-ESTEVE, J. i CALVET, F.: Comunicación al IV Congreso Nacional de Bioquímicos Españoles, (1967). Resum n.º 41.
5. DIETRICH, L. S.: (*J. Biol. Chem.*), 211, 79 (1954).
6. DOMINGO, E., BOZAL, J. i CALVET, F.: «Revista Española de Fisiología», setembre 1967.
7. FEIGELSON, P., FEIGELSON, M. i WOOD, T. R.: «Science», 120, 502 (1954).
8. FRIEDEMANN, T. E. i HAUGEN, G. E.: (*J. Biol. Chem.*), 147, 415 (1943).
9. HOFSTEE, B. H. J.: (*J. Biol. Chem.*), 216, 235 (1955).
10. MARÍN, A., MARTÍN-ESTEVE, J., BOZAL, J. i CALVET, F.: «IV International Congress of Biochemistry», Abstracts Volume, New York, 1964.
11. MARÍN, A., MARTÍN-ESTEVE, J. i CALVET, F.: «Rev. Esp. Fisiol.», 20, 175 (1964).
12. MARTÍN-ESTEVE, J., BOZAL, J. i CALVET, F.: «Archiv. Interamer. Rheumatol.», 7, 456 (1964).
13. MARTÍN-ESTEVE, J., BOZAL, J. i CALVET, F.: «Fed. Biochem. European Societies», p. 80 (1964).
14. RAMIA, J., BOZAL, J. i CALVET, F.: «Rev. Esp. Fisiol.», 22, 85 (1966).
15. STIRPE, F. i DELLA CORTE, E.: «Biochem. J.», 94, 309 (1965).

*DISCUSSIÓ**Dr. ALEMANY*

Pregunta si la hipertèrmia febril actua inhibint aquestes accions enzimàtiques.

Dr. MARTÍN-ESTEVE

Diu al doctor Alemany que els treballs han estat fets a 37°C. Amb tot, li consta que, a 43°C, la xantindeshidrogenasa no sofreix cap mena d'inactivació, cosa que, certament, no passa amb altres enzims.