

Distribuição da xantina oxidase no fígado e no sôro de rato*

por

Gilberto G. Villela, Ottilia R. Affonso, Luiz P. Ribeiro e Emilio Mitidieri
Laboratório de Bioquímica — Instituto Oswaldo Cruz

SCHARDINGER, em 1902, mostrou que o leite fresco descorava o azul de metileno, em presença de um aldeido. TROMMSDORFF verificou que esta reação se processa pela existência no leite, de um catalisador de natureza enzimática que passou, desde então, a ser conhecido com o nome de “enzima de Schardinger”. BACH, mais tarde, mostrou que esta enzima também podia ser revelada em tecidos animais. HOPKINS e MORGAN verificaram que a substância que induzia a redução do azul de metileno no leite, era uma purina (hipoxantina ou xantina). Esta purina funciona aí como um acceptor de oxigênio e o azul de metileno, como acceptor de hidrogênio. Tais autores demonstraram, subseqüentemente, que a enzima de SCHARDINGER era idêntica à xantina oxidase (X.O.), por êles descoberta no leite, ambas oxidando a xantina a ácido úrico, em presença de oxigênio (aerobiose) ou, sem oxigênio (anaerobiose) em presença de um acceptor de hidrogênio.

A identidade definitiva entre a enzima de SCHARDINGER e a X.O. dos tecidos foi estabelecida pelos estudos detalhados de DIXON e THURLOW (3). A oxidação da xantina e hipoxantina, tanto pelo oxigênio molecular como pela deshidrogenação em anaerobiose, é propriedade da mesma enzima. A oxidase é muito específica para o doador de hidrogênio (xantina, hipoxantina e aldeido) mas não o é para os aceptores de hidrogênio (Dixon). Além do azul de metileno, várias substâncias podem funcionar como aceptores de hidrogênio e entre elas o trifeniltetrazol, que tem sido utilizado em nossos estudos.

A xantina oxidase tem sido determinada principalmente pela técnica de descoramento do azul de metileno, em anaerobiose, nos tubos de Thunberg. A distribuição desta enzima como deshidrogenase foi estudada por MORGAN, em 1926, em tecidos de diversos animais (cão, gato, carneiro, cobra, coelho, pombo, porco, galinha). Quasi todos os dados referidos por MORGAN, foram qualitativos (10). Fígado, intestino e baço são os órgãos que contêm maior concentração de enzima. Em alguns animais, porém, o fígado é isento de atividade X.O. (cão, porco, pombo

* Este trabalho é dedicado ao Professor Dr. HENRIQUE B. ARAGÃO.

e cavalo). Outros autores apresentaram dados referentes à atividade deshidrogenase da enzima dos órgãos de diversas espécies de animais (ABDERHALDEN, OPPENEIMER, MORGAN, STEWART e HOPKINS), porém, nenhum deles procurou a enzima no sangue. Mais recentemente, BLAUCH e col., estudando o ácido úrico do sangue de rato, observaram que este quando incubado com xantina ou hipoxantina, apresentava sensível aumento no ácido úrico, dosado colorimetricamente. Estes autores também mostraram que a xantina oxidase do sangue de rato é idêntica à enzima do leite, pois as duas tem igual comportamento em face dos mesmos ativadores ou inibidores (2).

WESTERFELD, RICHERT e HILFINGER, num trabalho sobre a xantina oxidase durante a carcinogênese pelo p-dimetilaminoazobenzeno, dosaram espectrofotometricamente o ácido úrico resultante da oxidação da xantina, depois de incubar o sangue com esta purina, e encontraram valores de 50-60 microgramas de xantina oxidada por um mililitro de sangue (24).

A distribuição de vários constituintes celulares tem sido estudada intensamente no fígado e outros órgãos, pelo método da centrifugação fracionada, introduzido por BENSLEY e aperfeiçoado por CLAUDE. No que diz respeito à localização de enzimas no fígado, SCHNEIDER e HOGEBOMM mostraram que as mitocôndrias encerram a maior parte das enzimas oxidativas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (17). A uricase se localiza principalmente na fração mitocondrial (15), ao passo que a adenosina deaminase e nucleosídeo fosforilase acham-se situadas na porção das proteínas solúveis (18). Investigando a distribuição da xantina oxidase em homogenatos de fígado de rato, pela centrifugação fracionada, verificamos que esta enzima se encontra na fração das proteínas solúveis (23).

O sangue de rato foi também objeto de nossas investigações, no que diz respeito à distribuição da deshidrogenase nas frações das proteínas do soro. Em experiências preliminares por meio da precipitação com sulfato de amônio, foi possível verificar que toda xantina deshidrogenase estava confinada às globulinas, sendo a albumina desprovida de atividade X.D. Em estudo mais detalhado, usando a eletroforese em papel, conseguimos demonstrar que a enzima migrava com as globulinas do soro (9). Uma vez que a separação eletroforética, bem como a revelação no papel, ainda não foram aplicadas para o estudo desta enzima (7), achamos de interesse descrever detalhadamente a técnica empregada para tal fim, o que será feito mais adiante.

MÉTODOS E RESULTADOS

A distribuição da xantina oxidase e da xantina deshidrogenase, em fígado de rato, foi estudada pelo método da centrifugação fracionada dos componentes celulares (4).

Ratos albinos Wistar, machos, foram usados neste estudo. Os animais foram decapitados, os fígados imediatamente retirados e logo em

seguida colocados numa solução 0,25 M de sucrose, bem gelada. A polpa de fígado foi, então, pesada e depois homogenizada em um liquidificador, juntamente com 9 volumes da mesma solução de sucrose, bem gelada. Do homogenato (H) foi separada uma alíquota para a determinação das atividades X.O. e X.D. e dosagem de nitrogênio total e o restante foi centrifugado por 10 minutos a 600 x g. Após este tempo de centrifugação os núcleos (N) sedimentaram-se e foram separados, por decantação, do líquido sobrenadante (S₁). Os núcleos, depois de lavados duas vezes com solução de sucrose, foram colocados em 5 ml de uma solução tampão de pirofosfato de sódio, pH 8,6, para a determinação das atividades X.O. e X.D. e dosagem do nitrogênio total. As soluções de lavagem dos núcleos (N) foram juntadas ao sobrenadante (S₁) e centrifugadas por 10 minutos a 8 500 x g separando-se assim, por sedimentação, as partículas mitocondriais (Mt) e sobrenadante (S₂). Depois de aplicado à fração Mt o mesmo tratamento descrito acima para os núcleos (N), as mitocôndrias foram separadas. O sobrenadante (S₂) e as soluções de lavagem das Mt foram então centrifugados a 20 000 x g, por 60 minutos. Depois deste tempo de centrifugação separaram-se, por sedimentação, as partículas submicroscópicas (microsomas) (Mc) e uma última fração sobrenadante (S₃) (proteínas solúveis). Para as dosagens, os microsomas foram colocados em 5 ml de tampão pirofosfato. Todas as frações separadas foram examinadas microscópicamente, depois de coradas pelo Feulgen e "Janus green". As dosagens da atividade X.O. e X.D. e do nitrogênio total foram feitas no homogenato (H) e nas frações: núcleos (N), mitocôndrias (Mt), microsomas (Mc) e sobrenadante (S₃).

Para a dosagem da atividade da xantina oxidase, foi usado o método manométrico que mede o consumo de oxigênio em um respirômetro de Warburg. A técnica empregada foi semelhante à descrita por VILLELA e MITIDIERI (21) (22), na qual foi usado como tampão uma solução de pirofosfato de sódio pH 8,6 e como substrato 0,2 ml de uma solução 0,05 M de xantina dissolvida em NaOH 0,05 M. Os resultados para a atividade da X.O. foram expressos em milímetros cúbicos de oxigênio consumidos grama de peso seco 60 minutos.

Na determinação da atividade deshidrogenase foi usado o método de VILLELA (20), empregando tubos de Thunberg tendo como substrato 0,1 ml da mesma solução de xantina usada na determinação da oxidase e, como acceptor de hidrogênio, 0,3 ml de uma solução a 0,1% de cloreto de trifeniltretrazol (TTC). Depois da incubação a 37°C, por 30 minutos, a formazana produzida foi extraída com éter de petróleo e a cor lida em um colorímetro Unicam, em 480 m μ .

O nitrogênio total do homogenato e de cada fração foi determinado de acordo com o método descrito por LANNI e col. (6). Uma alíquota da fração a dosar, (contendo entre 5 e 80 γ), após digestão com H₂SO₄ e H₂O₂, foi tratada no mesmo tubo com reagente de Nessler e a cor formada lida imediatamente num colorímetro em 490 m μ .

Na Tabela I estão os resultados das determinações das atividades oxidase e deshidrogenase e da dosagem do nitrogênio nas diversas frações separadas por centrifugação.

TABELA I

Distribuição intracelular da xantina oxidase em fígado de rato

FRAÇÕES	XANTINA OXIDASE		XANTINA DESHIDROGENASE		Nitrogênio total***
	Atividade*	%	atividade**	%	
Homogenato (H)	1 077	100	1 270	100	3 295
Núcleos (N)	0	0	0	0	480
Mitocôndrias (M ⁺)	0	0	0	0	769
Microsomas (Mc)	0	0	0	0	635
Sobrenadante (S ₃)	69	64,17	1 325	104,3	1 695

* mm³ O₂/g de peso seco/60 minutos.

** µg de formazana produzida /g de peso seco/30 minutos.

*** µg de nitrogênio / 100mg de fígado.

Na Figura I estão relacionados os diversos valores do nitrogênio das frações e as atividades X.O. e X.D. Pode-se notar claramente, tanto na tabela como na figura I, que somente a fração que contém as proteínas solúveis, sobrenadante (S₃), apresenta atividade quer de deshidrogenase quer de oxidase. Os valores obtidos para o conteúdo em nitrogênio das frações estão de acordo com os resultados apresentados por outros autores (17), indicando que as frações são perfeitamente homogêneas.

A distribuição da X.D. no sôro de rato foi, preliminarmente, verificada nas frações globulina e albumina separadas por precipitação com sulfato de amônio. A precipitação foi feita adicionando-se a uma determinada quantidade de sôro, igual volume de uma solução saturada de sulfato de amônio (cujo pH foi previamente ajustado a 7,4, com NH₄OH) de modo que a concentração final de (NH₄)₂SO₄ ficou sendo 50%. Nessas condições precipitam as globulinas, ficando em solução a albumina. A fração globulina foi então separada por centrifugação, dissolvida em água destilada e dializada, num saco de celofane, durante 24 horas, contra água destilada, a baixa temperatura. A fração albumina, depois de separada, foi dializada do mesmo modo que a fração globulina. A determinação da atividade de X.D. foi feita nas duas frações usando-se a técnica já descrita anteriormente. Somente a fração globulina apresentou atividade X.D. Após êsses resultados preliminares foi realizado um estudo mais detalhado em que se fez o fracionamento do sôro por meio de eletroforese em papel.

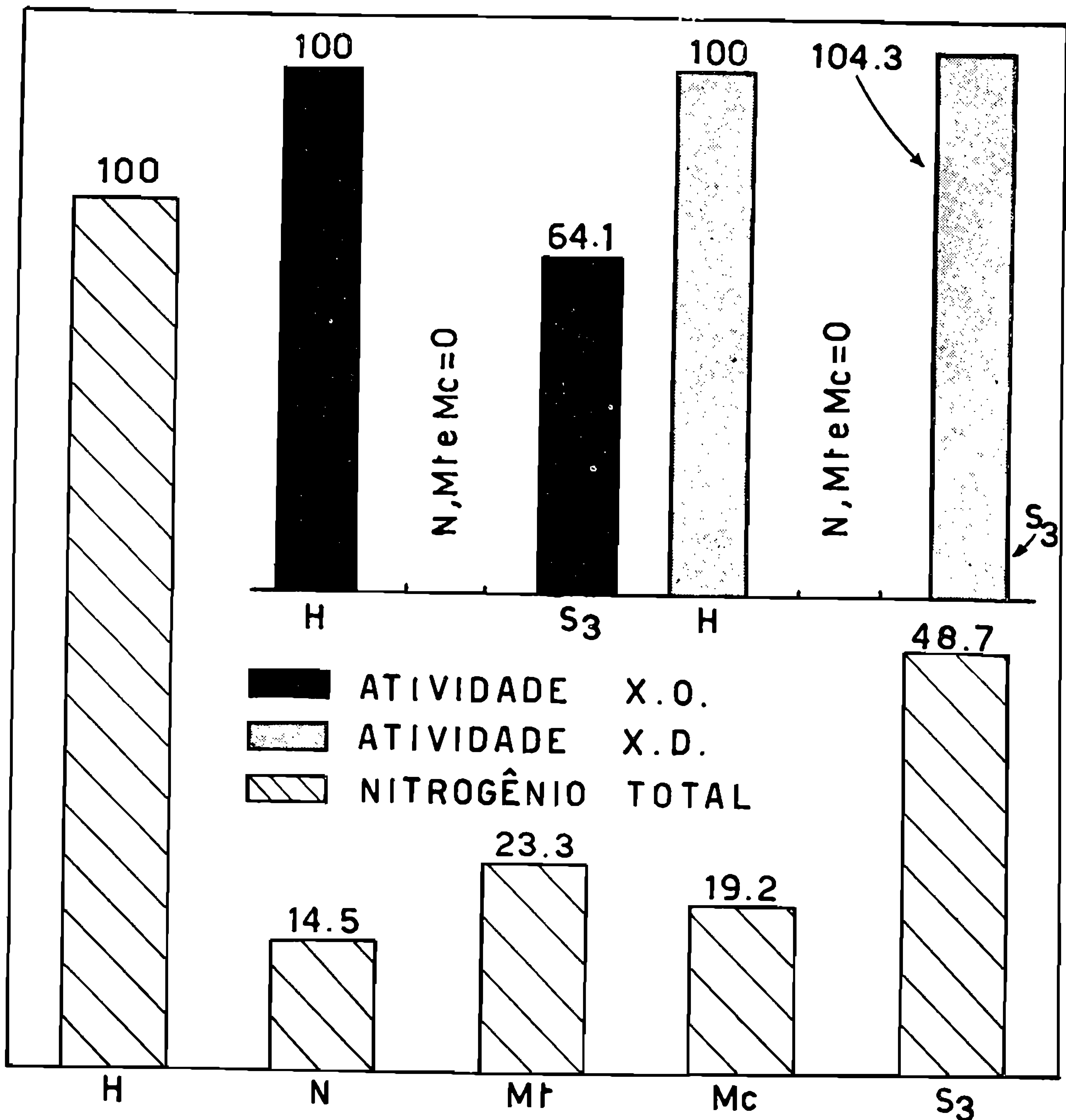
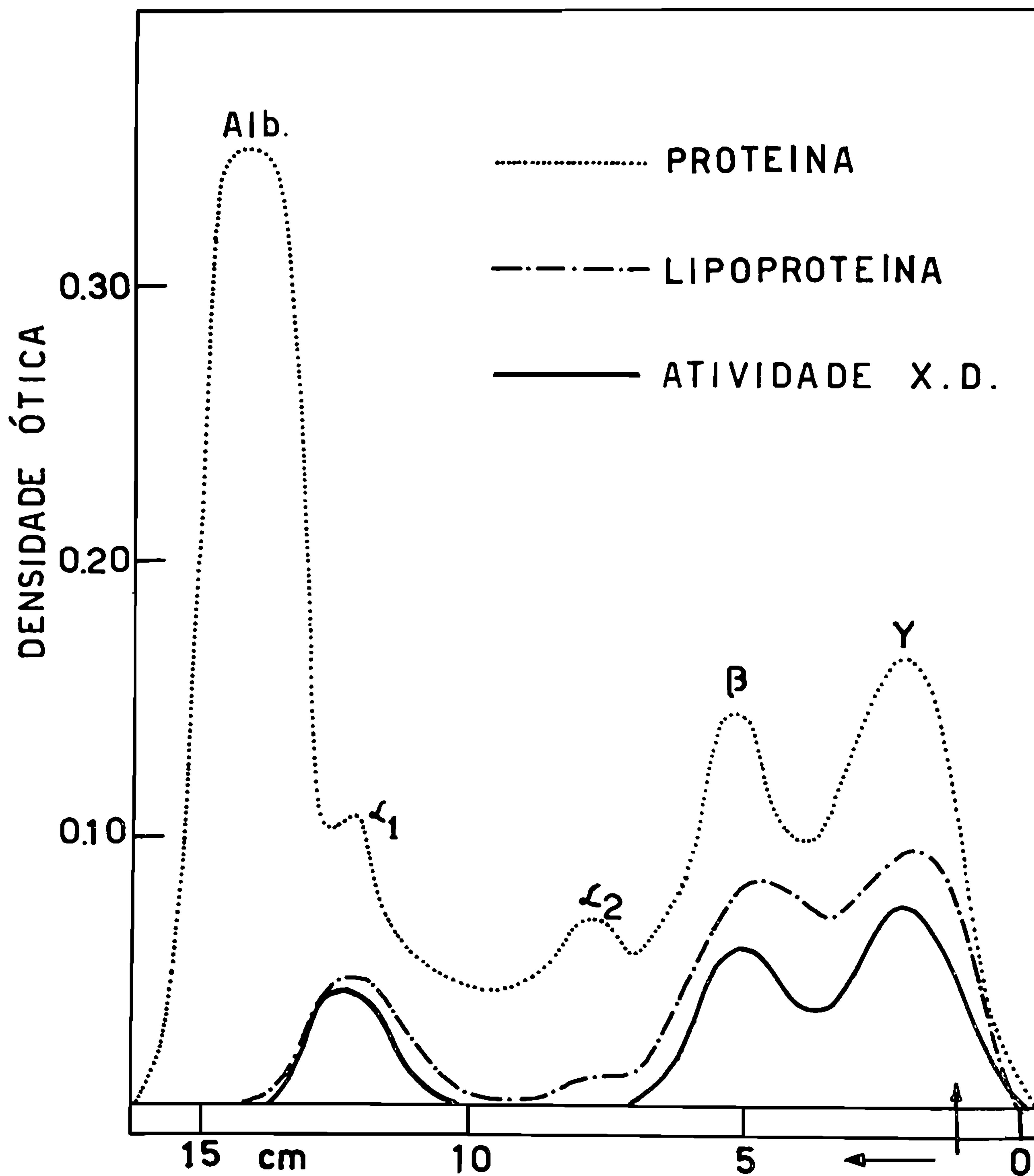


Fig. 1: Distribuição intracelular do nitrogênio, xantina oxidase e xantina desidrogenase, em fígado de rato. Os números representam percentagem. (H = homogenato; N = núcleo; Mt = Mitocondrias; Mc = Microsomas e S₃ = Sobrenadante).

As separações eletroforéticas foram realizadas num aparelho descrito anteriormente (12), com algumas modificações (13). Em tôdas as experiências usou-se tampão de fosfato pH 7,4, uma vez que foi verificado que a X.D. tinha sua atividade parcialmente inibida quando se empregava tampão de barbital pH 8,6, mais comumente usado em eletroforese em papel. Numa tira de papel Whatman n.º 3 (10 cm x 57 cm) foram pipetados 0,01 ml de sôro de rato para revelação das frações proteicas e 0,2 ml (em 10 pontos adjacentes com 0,02 ml cada um) para a determinação da atividade enzimática ou das frações lipo-

protéicas. A revelação das proteínas foi feita usando o método da eluição (5) empregando-se carbonato de sódio (2%) em álcool metílico a 50%.



Para a determinação das frações lipoprotéicas do sôro empregou-se o método descrito por SWAHN (19) que revela as frações corando-as com "Sudan black" e depois de eluição com uma solução de ácido acético em álcool, a cor é lida em um colorímetro em 590 m μ .

A determinação da atividade X.D. nas frações separadas por eletroforese foi feita cortando-se as tiras de papel em segmentos paralelos de 1,5 cm. Estes pedaços de papel foram então colocados em tubos de Thunberg contendo 5 ml de solução tampão de fosfato pH 7,4. No ramo lateral dos tubos de Thunberg foi colocado o substrato (0,1 ml de solução de xantina) e o acceptor de hidrogênio (trifeniltetrazol 0,1%). Depois de feito o vácuo, os tubos foram colocados num banho-maria, a 37°C. Após 10 minutos de incubação, o substrato e o acceptor de hidrogênio foram misturados com o conteúdo do tubo. A incubação total foi de 18 horas e, depois deste tempo, a formazana produzida foi extraída e a cor lida, como descrito acima. Tubos contendo papel sem proteína foram incubados para servir de "blank".

Os resultados mostram que a atividade X.D. parece localizar-se nas frações α_1 , β e γ globulinas. Estas frações são as mesmas em que se apresentam as lipoproteínas, reveladas pelo "Sudan black", como ilustra a figura 2.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A xantina oxidase está ausente na fração mitocondrial (Mt), bem como nos núcleos (N) e microsomas (Mc). Somente na fração que contém as proteínas solúveis é que foi encontrada atividade de oxidase e deshidrogenase, confirmando os resultados obtidos por outros autores (8) (16). A mistura das quatro frações: $N + Mt + Mc + S_3$, deu uma recuperação para a atividade enzimática de 102%. A atividade da xantina oxidase da fração S_3 foi somente de 64,15% da atividade do homogenato inicial, enquanto que a atividade deshidrogenase da enzima foi de 104,3% daquela do homogenato. Esta menor percentagem obtida para a atividade oxidase na fração das proteínas solúveis (S_3), em comparação com a atividade deshidrogenase, pode ser explicada devido à maior estabilidade desta última, como foi mostrado por RICHERT e col. (14) em seus estudos sobre inibição da enzima.

A xantina deshidrogenase do leite se acha unida a um componente lipídico do qual pode ser separada pela adição de diversos solventes orgânicos (11). A possibilidade de que esta enzima no soro de rato também se encontre ligada às lipoproteínas, foi por nós verificada pela eletroforese em papel e revelação das lipoproteínas pelo "Sudan black", conforme a técnica de Swahn. A figura 2 mostra as curvas obtidas pela eletroforese e a migração da enzima com as frações de globulinas e de lipoproteínas. Este resultado parece indicar que o rompimento das ligações lipoproteicas liberta a enzima ativa, que se encontra parcialmente bloqueada. Isto explica, talvez, a ativação da xantina oxidase pelo tetracloreto de carbono, "in vitro" e "in vivo", e por outros solventes orgânicos, conforme foi demonstrado em outros trabalhos deste laboratório (21) (22) (1).

SUMMARY

The localization of the xanthine oxidase (X.O.) and xanthine dehydrogenase (X.D.) activities in rat liver have been studied using the separation of cytoplasmic particles into fractions by differential centrifugation. The results clearly demonstrate that practically all the enzymic activity is present in the supernatant fluid corresponding to the cell sap containing the soluble proteins of the cell. No activity could be detected for the nuclear, mitochondrial and microsomal fractions. The enzymatic activity of the mixture of the four fractions was 102 per cent of that of the original homogenate.

The distribution of the xanthine dehydrogenase in the protein fractions of the rat serum was accomplished in preliminary experiments by means of 50% ammonium sulphate precipitation and subsequent dialysis against water. All enzymatic activity was confined to the globulin fractions of the serum. Paper electrophoresis was performed and the protein and lipoprotein fractions determined. A method for the localization of the X.D. activity in the protein fractions separated by paper electrophoresis was developed. The results obtained suggest that xanthine dehydrogenase is localized in the globulin fractions possessing mobilities of α_1 , β and γ globulins and are probably bound to the lipoproteins.

BIBLIOGRAFIA

1. AFFONSO, O.R., MITIDIERI, E., RIBEIRO, L.P. & VILLELA, G.G., *Blood serum xanthine oxidase of rats poisoned with carbon tetrachloride*. To be published.
2. BLAUCH, M.B., KOCH, F.C. & HANKE, M.E., 1939, A study of xanthine oxidase of art blood. *J. Biol. Chem.* 130 : 471-486.
3. DIXON, M. & THURLOW, S., 1925, Shudies on xanthine oxidase. *Bioch. J.* 19 : 672-675.
4. HOGBOOM, G.H., SCHNEIDER, W.C. & PALLADE, G.E., 1948, Cytochemical studies of mammalian tissues. I. Isolation of intact mitochondria from rat liver; Some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.*, 172 : 619-635.
5. KUNKEL, H.G. & TISELIUS, A., 1951, Electrophoresis of proteins on filter paper. *J. Gen. Physiol.*, 35 : 89-118.
6. LANNI, F., DILLON, M.L. & BEARD, J.N., 1950, Determination of small quantities of nitrogen in serological precipitates and other biological materials. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 74 : 4-7.
7. McDONALD, H.J., LAPPE, R.J., MARBACH, E.P., SPITZER, R.H. & URBIN, M.C., 1955, Ionography: Electrophoresis in stabilized media. Year Book Publishers, Inc. Chicago, pg. 156-161.
8. MEIKLEHAM, V., WELLS, I.C., RICHERT, D.A. & WESTERFELD, W.W., 1951, Liver esterase and xanthine oxidase during protein depletion. *J. Biol. Chem.*, 192 : 651-661.
9. MITIDIERI, E., RIBEIRO, L.P., AFFONSO, O.R. & VILLELA, G.G., 1955, Localization of xanthine dehydrogenase in rat serum by paper electrophoresis. *Bioch. Biophys. Acta*, 17 : 587.

10. MOSGAN, E.J., 1926, The distribution of xanthine oxidase. *Bioch. J.*, 20 : 1282-1291.
11. POLONOVSKY, M., BANDU, L. & NEUZIL, E., 1947, Xanthine dehydrase et cénapses lipo-protéidiques du lait de vacche. *Bull. Soc. Biol.*, 29 : 958-967.
12. RIBEIRO, L.P., 1955, Electroforese em papel e sua aplicação clínica. *O Hospital*, 47 : 169-175.
13. RODRIGUES, E. & RIBEIRO, L.P., 1954, Montagem simples para electroforese em papel para uso em laboratórios clínicos. *O Hospital*, 46 : 611-616.
14. 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 : 261-274.
15. SCHEIN, A.H., PODBER, E. & NOVIKOFF, A.B., 1951, Intracellular localization of uricase. *J. Biol. Chem.*, 190 : 331-337.
16. SCHEIN, A.H. & YOUNG, E.M., 1952, Xanthine oxidase distribution in liver cell-fractions. *Fed. Proc.*, 11 : 282.
17. SCHNEIDER, W.C. & HOGBOOM, G.H., 1950, The isolation of cell components by differential centrifugation. *A review. Cancer Res.*, 11 : 1-22.
18. SCHNEIDER, W.C. & HOGBOOM, G.H., 1952, Intracellular distribution of enzymes. IX. Certain purine-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.*, 195 : 161-174.
19. SWAHN, B., 1952, A method for localization and determination of serum lipids after electrophoretical separation on filter paper. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 4 : 98-103.
20. VILLELA, G.G., 1954, Determination of rat liver xanthine dehydrogenase by triphenyltetrazolium chloride. *Rev. Bras. Biol.*, 14 : 455-458.
21. VILLELA, G.G. & MITIDIÉRI, E., 1955, Rat liver xanthine oxidase in carbon tetrachloride poisoning. *Nature*, 175 : 208-209.
22. VILLELA, G.G. & MITIDIÉRI, E., 1955, Effect of carbon tetrachloride on the rat liver xanthine oxidase. *Rev. Bras. Biol.*, To be published.
23. VILLELA, G.G., MITIDIÉRI, E. & AFFONSO, O.R., 1955, Intracellular distribution of xanthine oxidase in the rat liver. *Nature*, 175 : 1087.
24. WESTERFELD, W.W., RICHERT, D.A. & HILFINGER, M.F., 1950, Studies on xanthine oxidase during carcinogenesis by p-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.*, 10 : 486-494.